

COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 5^{ème} ÉDITION -

AMPHITHÉÂTRE LUTON
FACULTÉ DE MÉDECINE - SITE COCHIN
24, RUE DU FAUBOURG SAINT-JACQUES, 75014 PARIS

« STRUCTURE CHROMATINIENNE ET ARN NON-CODANT DANS LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES »

MARDI
7 DÉCEMBRE
2021




FIRENDO

FILIÈRE MALADIES RARES ENDOCRINIENNES



<http://www.firendo.fr/colloque-recherche-2021/programme/>

ACCUEIL

9h00 - 9h30

Hall du bâtiment de
la Faculté de Médecine

9h30 - 12h10

CONFÉRENCES

Amphithéâtre Luton

9h30 - 9h35 Ouverture du Colloque

Anne-Paule GIMENEZ-ROQUEPLO, Antoine MARTINEZ et Nicolas DE ROUX,
coordinateurs du Groupe de Travail FIREENDO dédié à la Recherche

9h35 - 10h20 - INTRODUCTION

9h35 - 10h20 Les variants de structure des chromosomes, révélateurs de l'architecture du génome et des pathologies génétiques de la 3^e dimension

Jean-Michel Dupont, AP-HP Centre Université de Paris, site Cochin, Paris ;
INSERM U1016, Institut Cochin, Paris

10h20 - 11h30 - SESSION 1 - L'ÉPIGÉNÉTIQUE

10h20 - 10h40 Le profil de méthylome du sang total comme biomarqueur de l'excès des glucocorticoïdes

Roberta Armignacco, Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014, Paris, France

10h40 - 11h00 Épimutation *SDHC* : un nouveau mécanisme mutationnel à l'origine des paragangliomes et tumeurs gastrointestinales stromales *SDHx*-dépendants

Alexandre Buffet, Université de Paris, PARCC, INSERM, Équipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, F-75015 Paris, France ; Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital européen Georges Pompidou, Service de Génétique, 75015 Paris, France

11h00 - 11h30 Pathologies liées à l'empreinte parentale : des problèmes de réseau ?

Frédéric Brioude, Sorbonne Université, Hôpital Trousseau, UF d'Endocrinologie Moléculaire et Pathologie d'Empreinte ; Inserm UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine

11h30 - 12h10 - SESSION 2 - MI-ARN

11h30 - 11h50 MicroRNAs et tumeurs neuroendocrines hypophysaires (PitNET)

Anne Wierinckx, Université Lyon 1, Lyon, France ; CRCL - Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon - Inserm U1052 - CNRS U5286, Lyon, France ; ProfileXpert, SFR-Est, CNRS UMR-S3453, INSERM US7, Lyon, France

11h50 - 12h10 microARN et carcinome corticosurrénalien : fonction et potentiel clinique

Nadia Cherradi, INSERM U1292 - CEA - Université Grenoble Alpes - Laboratoire « Biologie et Biotechnologies pour la Santé », Institut Interdisciplinaire de Grenoble (IRIG) ; CEA Grenoble

PAUSE DÉJEUNATOIRE

12h10 - 14h00

Hall du bâtiment de
la Faculté de Médecine

14h00 - 15h40

CONFÉRENCES

Amphithéâtre Luton

14h00 - 15h00 - SESSION 3 - ADN NON-CODANT ET RÉGULATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES

14h00 - 14h20 Les régions 3' et 5' non-codantes des ARN : intérêt et complexité de leur analyse dans les maladies génétiques rares

Clémence Delcour, Laboratoire de Biochimie-Hormonologie ;
INSERM U1141 - Équipe neurodev, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris

14h20 - 14h40 Mise en place d'un test fonctionnel d'épissage par minigène - application au diagnostic des diabètes monogéniques

Delphine Bouvet, Département de Génétique Médicale, AP-HP Hôpital Pitié-Salpêtrière,
DMU BioGeM, Sorbonne-Université

14h40 - 15h00 Identification d'isoformes non codantes du gène *VHL* et impact des mutations associées à la maladie de von Hippel-Lindau

Betty Gardie, École Pratique des Hautes Études, Nantes

15h00 - 15h40 - SESSION 4 - RENDU ET ANNONCE DIAGNOSTIQUE

15h00 - 15h20 Intégrer la complexification des tests génétiques dans la pratique clinique

Anne-Paule Gimenez-Roqueplo, Département de Génétique et de Médecine Génomique des Tumeurs et Cancers, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital européen Georges Pompidou, F-75015, Paris, France ; Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75006, Paris, France

15h20 - 15h40 Résultat imprévu / Réactions imprévues

Khadija Lahlou-Laforet, Consultation Multidisciplinaire d'oncogénétique dédiée aux Cancers Rares et Unité de Psychiatrie de Liaison, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris

15h40 - 16h00

PAUSE

Suite du programme >>>

16h00 - 17h00

TABLE RONDE - MUTATIONS MOSAÏQUES

Amphithéâtre Luton

16h00 - 16h20 Quand les séquences codantes ne suffisent plus : exemple des AIS (insensibilités aux androgènes)

Delphine Mallet, Biochimie et Biologie Moléculaire des Hospices Civils de Lyon - UM des Pathologies Endocriniennes et Mucoviscidose ; Centre de référence MR DEVGEN ; Groupe thématique « Diagnostique génétique et dépistage néonatal » de Firendo ;

16h20 - 16h40 Test génétique du paragangliome : le challenge des mutations mosaïques

Nelly Burnichon, Laboratoire de médecine génomique des tumeurs et cancers, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris

16h40 - 17h00

Nicolas de Roux, Laboratoire de Biochimie-Hormonologie ;
INSERM U1141 - Équipe neurodev, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris

17h00 - 17h05

MOT DE CLOTURE

Cette année, la journée de la recherche de FIRENDO aura pour thème « **Structure chromatinienne et ARN non-codant dans les maladies rares endocriniennes** ».

Depuis de nombreuses années, l'analyse du génome est essentiellement centrée sur la recherche de mutations perte ou gain de fonction, voire de variants du nombre de copies des gènes. Ces approches qui apparaissent simples aujourd'hui ont nécessité des années de recherche et développement et ont été possibles grâce à des sauts technologiques majeurs comme le séquençage à haut débit. Plus de 30 ans après la description des premières mutations, il apparaît que ces événements génétiques ne sont identifiés comme étant responsables de la pathologie que dans 50 % des cas étudiés. Il nous faut donc désormais envisager de nouveaux mécanismes, sortis du « tout codant » et repenser les approches diagnostiques à la lumière des plus récentes découvertes sur le contrôle de l'architecture de la chromatine et de l'expression génomique.

Durant cette journée, 3 exemples de liens étroits entre génome non-codant et maladies endocriniennes rares seront abordés. Dans un premier temps, l'importance d'analyser la structure chromatinienne sera présentée. Les mécanismes testés sont particulièrement originaux et mettent en avant l'organisation dynamique du génome non-codant. De même, sera précisé le lien entre méthylation de l'ADN et phénotypes endocriniens rares. Le rôle des microARN sera également abordé en prenant l'exemple de tumeurs endocriniennes rares.

Bien que le nombre de mutations dans les séquences non-codantes des gènes soit en augmentation constante, le lien avec le phénotype est parfois difficile à affirmer. Cela est certainement dû à la difficulté d'étudier les conséquences fonctionnelles de ces variants. Trois présentations porteront sur les mécanismes et les difficultés à confirmer le lien génotype-phénotype en cas de mutations dans les régions non-traduites des ARN codants.

La complexité croissante des analyses génétiques et des mécanismes pose la question de l'information donnée aux patients avant la réalisation du test mais également lors du rendu des résultats. Ainsi, les incertitudes sur le lien entre le génotype observé et le phénotype peut être générateur d'anxiété pour le patient mais également pour le clinicien. La démarche multidisciplinaire doit être privilégiée. Cet aspect sera abordé dans un quatrième temps via 2 conférences et une table ronde autour de la problématique des mutations en mosaïque.

Nous espérons que ce programme qui aborde des mécanismes génétiques complexes mais également des aspects pratiques vous séduira et nous espérons que vous serez nombreux, chercheurs, médecins et biologistes, à assister à cette nouvelle édition du Colloque Recherche de FIRENDO !

Nicolas DE ROUX, Anne-Paule GIMENEZ-ROQUEPLO et Antoine MARTINEZ
pour le groupe Recherche de FIRENDO

JEAN-MICHEL DUPONT

AP-HP Centre Université de Paris, site Cochin, Paris

INSERM U1016, Institut Cochin, Paris

Les variants de structure des chromosomes, révélateurs de l'architecture du génome et des pathologies génétiques de la 3^e dimension

Historiquement, le caryotype a constitué le premier test génétique utilisable en routine diagnostique. Il a ainsi permis de révéler des anomalies chromosomiques de nombre et de structure, mais il a surtout, malgré sa faible résolution, constitué le premier moyen d'identifier les gènes responsables de nombreuses pathologies génétiques.

Les progrès des techniques de biologie moléculaire d'une part et l'établissement de la carte du génome d'autre part nous donnent aujourd'hui une puissance d'analyse permettant de révéler une cause génétique (mutation ponctuelle, variant de nombre de copie (CNV), anomalie de nombre des chromosomes (aneuploïdie), variant de structure) dans plus de 60% des patients examinés. Ce taux de détection est bien entendu variable en fonction des pathologies, de notre connaissance des gènes et des voies métaboliques impliquées et des mécanismes génétiques concernés, mais il plafonne malgré le déploiement du séquençage pan-génome pour deux raisons principales : sur un plan conceptuel en raison d'une lecture linéaire et centrée sur les séquences codantes (moins de 2% du génome) et sur un plan technologique de par les limites des techniques actuelles à révéler la complexité des réarrangements de structure du génome.

Les techniques de FISH 3D et-surtout de capture de la conformation chromatinienne (3C) ont conduit à une meilleure compréhension de l'organisation fonctionnelle du génome et à la mise en évidence de l'architecture tridimensionnelle de la chromatine et de son importance pour la régulation transcriptionnelle. À l'opposé de la vision statique et linéaire inhérente à la représentation graphique classique de la carte du génome, les techniques 3C révèlent des interactions à distance rendues possibles par une organisation dynamique à base de boucles d'ADN permettant de rapprocher les gènes de leurs séquences régulatrices. Cette organisation fonctionnelle est renforcée par des systèmes d'isolants chromatinien permettant de restreindre ces interactions à des sous domaines particuliers (les TADs pour Topologically Associating Domains).

Cette ouverture vers une nouvelle dimension de la génétique où des anomalies génomiques qui ne concernent pas directement des gènes peuvent perturber leur expression et aboutir à un phénotype clinique, rend indispensable une meilleure détection des variants de structure en diagnostic. Les techniques actuelles ont chacune leurs limites (une résolution insuffisante pour le caryotype, la non détection des anomalies équilibrées pour l'ACPA (Analyse Chromosomique sur Puce à ADN), une faible spécificité pour le séquençage haut débit de court fragments d'ADN utilisé en routine) qui imposent de nouvelles stratégies pour détecter efficacement les réarrangements chromosomiques de structure. Les deux approches les plus prometteuses sont le séquençage de grands fragments d'ADN qui permet d'améliorer la précision d'analyse au niveau des séquences répétées au sein desquelles on trouve de nombreux points de cassure, et la cartographie optique du génome. Cette dernière approche n'utilise pas le séquençage mais une reconstruction de novo du génome du patient à partir d'images obtenues après linéarisation de molécules d'ADN de grande taille. Elle permet une visualisation au kilobase près (voire moins dans certaines régions) des remaniements de structure, qu'ils soient déséquilibrés ou équilibrés.

Ces deux techniques ouvrent de nouvelles perspectives (mais aussi de nouvelles questions) dans la précision de l'identification des variants de structure, ce qui, en association avec les nombreux efforts visant à cartographier les séquences régulatrices, les TADs, les ARN non codants etc., devraient nous permettre d'améliorer le rendement des analyses génétiques au bénéfice des patients.

jean-michel.dupont@aphp.fr

ROBERTA ARMIGNACCO

Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014, Paris, France

Le profil de méthylome du sang total comme biomarqueur de l'excès des glucocorticoïdes

Les dosages hormonaux sur lesquels s'appuie le diagnostic d'hypercortisolisme (syndrome de Cushing) ne reflètent pas les effets individuels d'imprégnation en glucocorticoïdes. Pour identifier des biomarqueurs spécifiques, le méthylome du sang total a été analysé dans une cohorte de 94 échantillons de 47 patients avec différent statut cortisolique -syndrome de Cushing, eucortisolisme, insuffisance surrénalienne. Le profil de méthylation discrimine les échantillons selon leur statut, avec une marque d'hyperméthylation dans les Cushing, qui montre une cinétique de modification dans le temps. Un groupe de 29 sites de méthylation (CpGs) discrimine le statut de Cushing dans une sous-cohorte d'entraînement (n=60). La performance de ce prédicteur est validée dans le reste des échantillons (n=34) et dans une deuxième cohorte de validation indépendante (n=91). Le niveau de méthylation d'un seul des 29 CpGs, associé au promoteur du gène FKBP5, récapitule la discrimination par statut cortisolique dans les deux cohortes. En conclusion, le méthylome mesure l'imprégnation individuelle en glucocorticoïdes. L'optimisation de techniques simples de mesures ciblées de méthylation, la performance du prédicteur dans les hypercortisolismes a minima, et les liens du profil de méthylation avec les complications d'hypercortisolisme restent à explorer.

roberta.armignacco@inserm.fr

ALEXANDRE BUFFET

Université de Paris, PARCC, INSERM, Équipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, 75015 Paris, France

Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital européen Georges Pompidou, Service de Génétique, 75015 Paris, France

Épimutation *SDHC* : un nouveau mécanisme mutationnel à l'origine des paragangliomes et tumeurs gastrointestinales stromales *SDHx*-dépendants

L'immunohistochimie anti-SDHB (IHC SDHB) est un outil robuste pour orienter vers une mutation sur l'un des gènes *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*) dans les paragangliomes (PGL) ou les tumeurs gastrointestinales stromales (GIST)¹. Néanmoins chez certains patients aucune mutation constitutionnelle ou somatique *SDHx* n'est mise en évidence, même en utilisant les nouvelles techniques de séquençage à haut débit (NGS) permettant d'explorer l'ensemble des gènes de prédisposition et en particulier les gènes *SDHx*, alors que l'IHC SDHB est négative dans leur tumeur. Une analyse de méthylome a révélé des épimutations (hyperméthylation du promoteur) du gène *SDHC* chez des patients avec GIST et/ou PGL². Notre objectif était de développer une méthode permettant de détecter une épimutation *SDHC* en routine diagnostique puis de valider l'implication de ce nouveau mécanisme mutationnel en clinique.

Nous avons mis au point l'analyse par pyroséquençage de 7 îlots CpG du promoteur du gène *SDHC* puis étudié l'ADN tumoral préalablement traité au bisulfite de différents patients avec PGL, GIST ou dyade de Carney (association PGL et GIST), qui avaient un test génétique du PGL par NGS + MLPA négatif³ et une tumeur SDHB immuno-négative. Nous avons détecté chez plusieurs d'entre eux une épimutation *SDHC* dont plusieurs à l'état de mosaïque constitutionnelle. Ainsi, la recherche d'une épimutation du gène *SDHC* par pyroséquençage est indiquée après un test génétique par NGS négatif et une immunohistochimie tumorale SDHB négative, en particulier dans les formes pédiatriques de GIST associées ou non à un PGL.

alexandre.bufferet@aphp.fr

1. Papathomas TG. Mod Pathol 2015;28:807

2. Killian JK. Cancer Discov 2013;3:648

3. Toledo RA, Burnichon N. Nat Rev Endocrinol 2017;13:233

FRÉDÉRIC BRIOUDE, ÉLOISE GIABICANI, IRÈNE NETCHINE

Sorbonne Université, Hôpital Trousseau, UF d'Endocrinologie Moléculaire
et Pathologie d'Empreinte

Inserm UMR_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine

Pathologies liées à l'empreinte parentale : des problèmes de réseau ?

Les maladies liées à l'empreinte parentale représentent un groupe de maladies rares affectant (entre autres) la croissance, la puberté et le métabolisme. Elles sont liées à des anomalies dans la fonction ou l'expression de gènes soumis à empreinte. Ces gènes (codant pour des protéines, mais aussi longs ARN non codants, microARN ou snoARN) ont une expression mono allélique, en fonction de l'origine parentale de l'allèle, et sont régulés par des régions différenciellement méthylées (DMR) entre les deux allèles. Bien que ces maladies soient dues à des anomalies dans des régions chromosomiques distinctes (11p15 (locus IGF2/H19) pour les syndromes de Beckwith-Wiedemann et Silver-Russell, 14q32 (locus DLK1/MEG3) pour le syndrome de Temple, 15q11-q13 (locus SNRPN) pour le syndrome de Prader-Willi par exemple), elles présentent des traits phénotypiques communs, soulevant l'hypothèse d'un réseau de gènes soumis à empreinte. Dans cette hypothèse, la dérégulation de l'expression de certains gènes (notamment des longs ARN non codants) à un locus donné pourrait modifier l'expression d'autres gènes en *trans* au niveau d'autres loci soumis à empreinte.

Les syndromes de Temple (ST14) et de Silver-Russell (SRS) sont deux maladies rares cliniquement proches associant notamment retard de croissance pré et post natal, puberté précoce ou avancée et troubles métaboliques. Le syndrome de Temple est dû (entre autres) à une perte de méthylation de la DMR du locus DLK1/MEG3 (IG-DMR) en 14q32 (sur l'allèle paternel). Le syndrome de Silver-Russell est lui dû dans 50 % des cas à une perte de méthylation de la DMR du locus IGF2/H19 (ICR1) en 11p15 (sur l'allèle paternel). Nous avons pu démontrer chez les patients ST14 qu'une déméthylation de l'IG-DMR dans la région 14q32 aboutit à la réexpression des ARN non codants MEG3 et MEG8 à partir de l'allèle paternel (allèle normalement silencieux). Cette modification était associée à une diminution de l'expression d'IGF2 (mécanisme habituel du SRS) bien que la méthylation au locus ICR1 soit normale chez ces patients, suggérant un mécanisme d'action en *trans* des ARN non codants de la région 14q32 sur les gènes de la région 11p15.

frederic.brioude@aphp.fr

ANNE WIERINCKX

Université Lyon 1, Lyon, France

*CRCL - Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon-Inserm U1052-CNRS U5286,
Lyon, France*

ProfileXpert, SFR-Est, CNRS UMR-S3453, INSERM US7, Lyon, France

MicroRNAs et tumeurs neuroendocrines hypophysaires (PitNET)

Les petits ARNs non codants (microARNs ou miARNs), découverts en 1993 chez *C. Elegans*, par Rosalind C. Lee et collaborateurs, ont un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. En s'hybridant en sens inverse aux ARNm complémentaires, ils induisent la dégradation rapide, ou l'inhibition de l'ARNm intervenant dans la traduction en protéine. En 2005, Bottoni A. et collaborateurs ont montré, pour la première fois, que certains miARN sont exprimés dans l'hypophyse normale. Depuis cette date, plus d'une centaine d'études ont analysé le rôle de ces miARNs dans la physiologie de l'hypophyse normale. De nombreux miARNs ont été trouvés dérégulés dans différents types de tumeurs hypophysaires, comparées à l'hypophyse normale.

Notre groupe, en association avec celui d'Alfredo Fusco (Naples), a montré que le miR196a-2, ciblant les protéines High Mobility Group (HMGA), gène suppresseur de tumeur, ou le miR-212, ciblant une protéine de l'apoptose, inducteur de tumeurs, sont dérégulés de façon différente dans tous les types de tumeurs (corticotrope, gonadotrope et non-fonctionnelle, lactotrope et somatotrope). En effet, chaque type de tumeur hypophysaire étant unique, toute étude moléculaire doit être spécifique de chaque type. Nous avons donc centré nos études sur le rôle de ces miARN dans l'agressivité/malignité des tumeurs lactotropes. Nous avons ainsi identifié plusieurs miARNs ciblant des gènes impliqués dans la prolifération tumorale. Nous avons montré une corrélation inverse entre l'expression de certains miARNs et leur cible, en particulier le miR-183, ciblant la protéine PCLAF (PCNA Clamp Associated Factor ou KIAA0101). Ce miRNA, régulateur de la réparation de l'ADN, a induit une prolifération cellulaire anormale, avec accumulation d'altérations génétiques, dans les tumeurs lactotropes agressives/malignes, comparées à des tumeurs bénignes.

L'étude conjointe des différents acteurs moléculaires sur un type spécifique de tumeurs hypophysaires et la comparaison avec d'autres tumeurs neuroendocrines – en particulier le phéochromocytome et les tumeurs pancréatiques différenciées (pNEN), tumeurs les plus proches des PitNETs – devraient permettre de cibler des traitements pharmacologiques, en modulant le niveau d'expression de ces microARNs dans les tumeurs neuroendocrines différenciées.

anne.wierinckx@univ-lyon1.fr

NADIA CHERRADI

INSERM U1292 - CEA - Université Grenoble Alpes - Laboratoire « Biologie et Biotecnologies pour la Santé », Institut Interdisciplinaire de Grenoble (IRIG)

CEA Grenoble

microARN et carcinome corticosurrénalien : fonction et potentiel clinique

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est une tumeur rare, agressive et de fort potentiel métastatique (incidence d'~2 cas/million/an). Au cours de ces dernières années, la caractérisation des altérations génomiques du CCS a conduit à l'identification de sous-groupes de tumeurs de pronostic hétérogène. Parmi ces altérations, une dérégulation significative de l'expression des microARN (miRNA) a été rapportée. Les miRNA sont de petits ARN non-codants qui répriment l'expression des gènes. Ils sont impliqués non seulement dans la biologie du cancer, dans sa survenue et sa progression, mais aussi dans des mécanismes de résistance aux thérapies. Cependant, leur rôle dans la physiopathologie du CCS reste à élucider. L'analyse de cohortes rétrospectives des réseaux COMETE et ENSAT nous a permis d'identifier des signatures tumorales et circulantes diagnostique et pronostique pour le CCS. Parmi les microARN circulants détectés dans le sérum des patients, certains sont des biomarqueurs de récidence prometteurs. Sur le plan fonctionnel, nous avons identifié des gènes ainsi que des voies de signalisation cibles de certains miRNA. À la lumière de ces résultats, nous développons actuellement une thérapie expérimentale basée sur la nanovectorisation d'inhibiteurs de miRNA par des nanoparticules lipidiques biocompatibles, dans des modèles précliniques de CCS.

nadia.cherradi@cea.fr

CLÉMENCE DELCOUR, NICOLAS DE ROUX

Laboratoire de Biochimie-Hormonologie, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris

INSERM U1141 - Équipe neurodev, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris

Les régions 3' et 5' non-codantes des ARN : intérêt et complexité de leur analyse dans les maladies génétiques rares

La génétique moléculaire des maladies rares est principalement centrée sur la recherche de variants rares responsables d'une perte de fonction des protéines. Cette analyse comprend la recherche de mutations faux sens ou non-sens de la séquence codante, des régions consensus d'épissage, de délétion ou duplication d'exons codants. Progressivement, les méthodes de screening de l'exome ou du génome offre la possibilité de rechercher des variants rares dans les régions non codantes des ARNs ou dans les régions régulatrices parfois à distance du gène et bien-sur dans les introns. La biologie de ces régions reste méconnue. Le but de cette présentation est d'ouvrir la discussion sur l'intérêt d'analyser les régions non codantes 5' et 3' des ARNs en donnant des exemples à partir de la littérature ou de l'expérience du laboratoire.

clemence.delcour@aphp.fr

DELPHINE BOUVET, AMÉLIE BLONDEL, CÉCILE SAINT-MARTIN,
CHRISTINE BELLANNÉ-CHANTELOT

Département de Génétique Médicale, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière,
DMU Bio-GeM, Sorbonne-Université

**Mise en place d'un test fonctionnel d'épissage par minigène -
application au diagnostic des diabètes monogéniques**

Introduction. L'interprétation des variants est une étape clé du diagnostic moléculaire. L'évaluation de leur impact sur l'épissage repose sur (i) les prédictions bioinformatiques mais celles-ci ne sont pas toujours concordantes et parfois non conclusives, et (ii) sur l'analyse de l'ARN du patient qui peut être limitée par la difficulté d'accès au tissu d'intérêt et la faible expression des gènes d'intérêt dans le sang. Les minigènes offrent une approche alternative en permettant d'étudier l'épissage à partir de l'ADN génomique du patient.

Méthodes. Analyse bioinformatique basée sur 4 algorithmes de prédiction d'épissage pour prioriser les variants à tester. Clonage de la région exonique \pm 150 pb de l'ADN du patient porteur du variant d'intérêt dans le vecteur d'expression (pCAS2) puis transfection dans la lignée cellulaire HeLa. Analyse des transcrits par RT-PCR puis électrophorèse sur gel d'agarose et séquençage Sanger.

Résultats et conclusion. Les résultats des algorithmes de prédiction ont permis de prioriser 47 variants sur les gènes *GCK* (28), *HNF1A* (11) et *HNF4A* (8). Les résultats préliminaires du test minigène pour 8 variants du gène *GCK* montrent que 5/8 conduisent à une anomalie d'épissage permettant de confirmer le diagnostic moléculaire de diabète monogénique. L'objectif du projet est d'intégrer le test minigène dans le diagnostic moléculaire de routine des 3 gènes majeurs impliqués dans les diabètes monogéniques.

delphine.bouvet@aphp.fr

BETTY GARDIE

École Pratique des Hautes Études

Identification d'isoformes non codantes du gène *VHL* et impact des mutations associées à la maladie de von Hippel-Lindau

Le gène *VHL* joue un rôle majeur dans la régulation de la voie de l'hypoxie. Des mutations germinales de *VHL* sont responsables de la maladie de von Hippel-Lindau caractérisée par le développement de tumeurs richement vascularisées dont des hémangioblastomes, des cancers du rein et des phéochromocytomes. Il a également été montré que des mutations de *VHL* étaient à l'origine de la « polyglobulie de Chuvash » caractérisée par un excès de production de globules rouges lié à un taux d'érythropoïétine élevé. Le gène *VHL* est constitué de 3 exons (E1, E2, E3) et nous avons récemment mis en évidence une structure complexe de ce gène avec la présence d'un exon cryptique (nommé E1') localisé entre les exons 1 et 2. Nous avons identifié des variations génétiques constitutionnelles de cet exon chez des patients atteints de polyglobulie ou de la maladie de *VHL* (Lenglet et al., 2018) ainsi que chez des patients ayant développé des paragangliomes et phéochromocytomes (Buffet et al., 2020). Nous avons développé différents tests fonctionnels (test rapporteur d'épissage « minigène », mesure de l'expression des différents transcrits *VHL*, différenciation de cellules souches pluri-potentes induites en cellules de la crête neurale) afin d'étudier l'impact des variants génétiques identifiés. Nous avons démontré que certains de ces variants siégeant sur ce nouvel exon cryptique entraînent bien une perturbation sévère de l'épissage du gène *VHL* mais l'impact fonctionnel d'autres variants, notamment ceux identifiées chez les patients atteints de phéochromocytomes, restent encore difficile à déterminer.

betty.gardie@univ-nantes.fr

ANNE-PAULE GIMENEZ-ROQUEPLO

*Département de Génétique et de Médecine Génomique des Tumeurs et Cancers,
Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital européen Georges Pompidou,
75015, Paris, France*

Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75006, Paris, France

Intégrer la complexification des tests génétiques dans la pratique clinique

Les tests génétiques à visée médicale visent à identifier variation(s) de séquence ou anomalie(s) de l'ADN responsable(s) d'une maladie ou d'une tumeur. Les progrès techniques permettent aujourd'hui d'analyser un seul gène, un panel de gènes, l'ensemble de l'ADN codant (l'exome) voire le génome entier. Alors que l'accès aux données génétiques est facilité par les développements technologiques et la diminution des coûts de séquençage, l'interprétation biologique des variants génétiques identifiés reste encore complexe. Ainsi, l'information préalable claire, loyale et adaptée du patient lors de la prescription d'un test génétique et l'explication des résultats lors des consultations médicales dédiées préconisées par la législation encadrant la réalisation d'un examen des caractéristiques génétiques à des fins médicales (Articles L1130-1 à L1133-10 du Code de la santé publique) se sont de fait complexifiées. Un renforcement des connaissances des médecins prescripteurs sur les incertitudes soulevées par la lecture du génome et sur les enjeux des tests génétiques pour les patients et leurs familles ainsi qu'une collaboration multidisciplinaire (associant spécialistes d'organes, médecins généticiens, généticiens et biologistes moléculaires, psychiatres et psychologues) encore plus étroite apparaissent nécessaires pour répondre de façon éthique à l'augmentation attendue de la demande de tests génétiques et à la pratique de la médecine génomique pour le diagnostic, le traitement ou la prévention.

anne-paule.gimenez-roqueplo@aphp.fr

KHADIJA LAHLOU-LAFORET

*Consultation Multidisciplinaire d'oncogénétique dédiée aux Cancers Rares et
Unité de Psychiatrie de Liaison, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris*

Résultat imprévu / Réactions imprévues

Les enjeux éthiques et psychologiques des tests génétiques ont été étudiés sous divers angles, notamment celui de l'anticipation des réactions du patient à un résultat génétique positif ou négatif. L'approche multidisciplinaire et la collaboration avec les psychologues et psychiatres a permis une meilleure connaissance de ces enjeux, qui s'intriquent avec l'histoire personnelle et familiale du patient, dans sa subjectivité. L'annonce d'un résultat positif ou négatif, suivant un protocole adapté en fonction des diverses situations, pouvait être délicate mais aboutissait à un résultat clair et net : présence ou absence de mutation génétique.

Depuis quelques années, l'avènement des nouvelles techniques de séquençage rajoute de la complexité aux enjeux psychologiques, en donnant la part belle à l'incertitude sur la signification du résultat génétique. Il en est ainsi pour les VSI, qui peuvent induire de la perplexité en raison de la notion qui est difficile à appréhender pour un néophyte, et souvent en raison de l'absence d'évocation d'une telle éventualité au moment de la prescription du test. L'imprévu peut prendre la forme d'une donnée incidente, ouvrant une série d'autres risques qu'il est souvent difficile de bien anticiper y compris lorsque le patient a signé un consentement éclairé pour être informé de la présence de variants constitutionnels dans des « gènes actionnables ». L'inattendu peut aussi surgir en cas de résultats non interprétables dans l'état actuel des connaissances, lorsque des variations génétiques sont identifiées dans des zones encore mal connues du génome.

S'il n'est pas aisé pour le généticien d'annoncer des résultats imprévus ou dont la signification est incertaine, il est inquiétant pour le patient de les découvrir le jour du résultat. Une réflexion portant sur la façon classique d'anticiper un résultat génétique (2 hypothèses possibles : positif ou négatif) pourrait s'enrichir d'une 3^{ème} voie : celle d'un résultat incertain ou imprévu.

khadija.lahlou-laforet@aphp.fr

**DELPHINE MALLET**

Biochimie et Biologie Moléculaire des Hospices Civils de Lyon - UM des Pathologies Endocriniennes et Mucoviscidose ; Centre de référence MR DEVGEN ;

Groupe thématique « Diagnostique génétique et dépistage néonatal » de Firendo

Quand les séquences codantes ne suffisent plus : exemple des AIS (insensibilités aux androgènes)

Le syndrome d'insensibilité aux androgènes se traduit par un défaut de virilisation des organes génitaux externes lié à l'incapacité des tissus cibles à répondre aux androgènes. Il est dû à des variant pathogènes du gène du récepteur aux androgènes (*AR*), situé sur le chromosome X. Trois formes sont décrites, complète (CAIS), partielle (PAIS) et modérée (MAIS). Le taux de diagnostic génétique est nettement plus élevé dans les CAIS (environ 95 %), que dans les PAIS où l'analyse des régions codantes et des jonctions exons-introns du gène *AR* ne retrouve des variants pathogènes que dans 20 à 40 % des cas selon les cohortes (Morel et al. 2005, Hornig et al. 2021). Le séquençage haut débit par panel, exome ou génome permet d'explorer de nouvelles causes moléculaires et de préciser l'implication de mécanismes déjà connus. Nous avons ainsi identifié par séquençage haut-débit des variants en mosaïque chez 5 patients présentant un PAIS. Il s'agit de variants impliqués dans les CAIS quand ils surviennent de manière constitutionnelle et qui ont un effet partiel lorsqu'il s'agit d'événements post zygotiques. L'effet de ces variants est dépendant de leur proportion dans le tissu affecté, difficilement évaluable en raison de la nature des tissus, ce qui peut compliquer la prise en charge médico chirurgicale des patients concernés. Ce phénomène était déjà décrit mais considéré comme rare (Holterhus et al. 1997, Köhler et al. 2005). La profondeur de séquençage générée par la technique haut-débit améliore la détection de ces mosaïques et confirme l'intérêt de cette technique dans l'exploration moléculaire. La nécessité d'explorer le gène *AR* entier, au-delà des régions codantes et des jonctions exons-introns, est également démontrée par la description d'un variant en 5'UTR créant un site d'initiation de la traduction en amont d'un cadre de lecture ouvert aboutissant à la synthèse d'un petit peptide, interférant avec la synthèse de la protéine normale (Hornig et al. 2016). D'autres pistes sont explorées pour tenter d'apporter un diagnostic aux cas de PAIS, en parallèle des mécanismes connus dans le cancer de la prostate ou dans les variations du développement sexuel dues à des remaniements dans la région régulatrice du gène *SOX9* : étude de la région 3'UTR et miRNAs, analyse des TAD (Topologically Associated Domains) autour du locus *AR*, profils de méthylation de la région promotrice. La validation fonctionnelle de ces mécanismes rares reste indispensable pour la prise en charge médico-chirurgicale des patients et le conseil génétique.

delphine.mallet@chu-lyon.fr

NELLY BURNICHON

Laboratoire de médecine génomique des tumeurs et cancers, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris

Test génétique du paragangliome : le challenge des mutations mosaïques

Au cours des 20 dernières années, nous avons assisté à une progression spectaculaire des connaissances sur la génétique des paragangliomes/phéochromocytomes (PPGL) pour lesquels on connaît aujourd'hui près de 20 gènes de prédisposition. Près de 40 % des patients sont porteurs d'une mutation constitutionnelle sur l'un de ces gènes, faisant des PPGL les tumeurs humaines présentant le plus fort degré d'héritabilité. Parmi les 60 % de patients pour lesquels le test génétique constitutionnel « classique » ne met pas en évidence de variation génétique causale, une analyse de l'ADN tumoral peut s'avérer utile. Cette dernière permet de rechercher soit une mutation somatique sur l'un des gènes de susceptibilité soit une mutation à l'état de mosaïque constitutionnelle. La mise en évidence de ce type de mutation nécessite le recours à des techniques particulières mais est essentielle, notamment lorsque le phénotype clinique est évocateur d'une maladie héréditaire. Enfin, l'identification d'un mosaïcisme est important afin d'adapter le conseil génétique et la prise en charge des familles concernées.

nelly.burnichon@aphp.fr

LES COLLOQUES RECHERCHE

Chaque année, le groupe de travail Recherche de la filière FIRENDO organise un Colloque Recherche sur un thème d'actualité, en lien avec la recherche sur les maladies rares endocriniennes. Vous pouvez retrouver toutes les informations sur la tenue des éditions précédentes sur le site internet de FIRENDO :

Édition 2017, intégrée à la Journée Annuelle de FIRENDO

<http://www.firendo.fr/journee-annuelle-2017/>



Édition 2018, « Dimorphisme sexuel dans les maladies rares endocriniennes »

<http://www.firendo.fr/colloque-recherche-2018/>



Édition 2019, « Innovations technologiques et maladies rares endocriniennes, du soin à la recherche »

<http://www.firendo.fr/colloque-recherche-2019/>



Édition 2020, « Les espoirs thérapeutiques dans les maladies rares endocriniennes »

<http://www.firendo.fr/colloque-recherche-2020/>

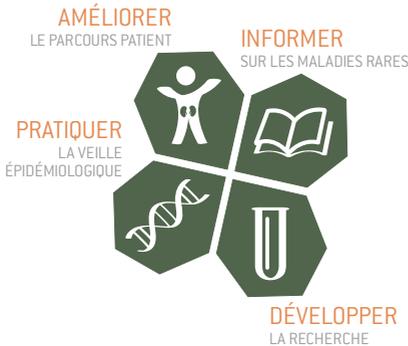


LA RECHERCHE SUR LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

La filière de santé maladies rares endocriniennes FIRENDO a pour vocation nationale de réunir les centres cliniques experts en maladies rares endocriniennes et de permettre des échanges avec les acteurs du secteur du diagnostic, de la recherche, de l'enseignement et du monde associatif au sein d'une réflexion collaborative.

Pour impulser un nouvel élan à la recherche sur les maladies rares endocriniennes, FIRENDO oeuvre pour renforcer le rôle de la France comme leader européen pour réduire l'impasse diagnostique et accélérer le développement de nouveaux traitements.

LES MISSIONS DE FIRENDO



LES ACTIONS DE FIRENDO

+14 CHERCHEURS, CLINIENS,
REPRÉSENTANTS DE PATIENTS CONSTITUANT
UN GROUPE DE TRAVAIL
DÉDIÉ À LA RECHERCHE
SUR LES MALADIES RARES
ENDOCRINIENNES

LES ACTEURS DE LA RECHERCHE



ACCÉLÉRER LA RECHERCHE SUR LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES



Faciliter les activités de recherche

Parce que les acteurs et les projets de recherche sont divers et nombreux, FIRENDO se place comme un facilitateur et un accélérateur de la recherche, en favorisant les actions concertées de tous.



Référencer les ressources et outils disponibles pour la recherche

FIRENDO recense auprès de ses membres les ressources et outils disponibles pour la recherche sur les maladies rares endocriniennes (modèles d'étude, cohortes de patients, biomarqueurs, molécules thérapeutiques, essais cliniques...) avec la vocation de les référencer et d'initier ainsi des collaborations.



Réaliser une veille bibliographique

Vous pourrez retrouver l'actualité scientifique de nos membres et plus largement de la recherche sur les maladies rares endocriniennes sur le site Internet.

www.firendo.fr/recherche-maladies-rares/com-scientifiques/



Recenser les appels à projet

Vous pourrez retrouver tous les appels à projet de recherche sur le site Internet.

www.firendo.fr/recherche-maladies-rares/aap/



Organiser des Colloques Recherche

Chaque année, FIRENDO organise la tenue d'un Colloque Recherche et invite des conférenciers nationaux et internationaux pour présenter les nouveautés dans le domaine des maladies rares endocriniennes.

www.firendo.fr/colloques-recherche-firendo/



Promouvoir les conférences et autres évènements scientifiques

Vous pourrez retrouver les évènements scientifiques sur le site Internet

www.firendo.fr/recherche-maladies-rares/conf-scientifique/

ainsi que des articles de rétrospectives, les vidéos des évènements...

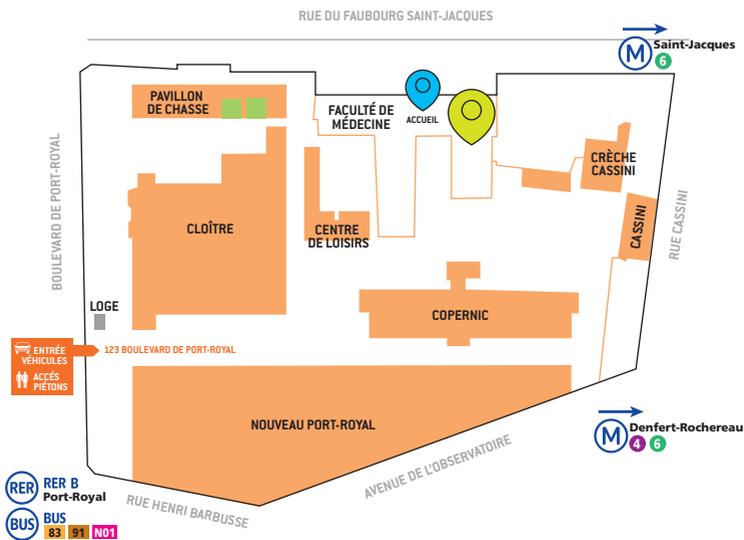


Encourager la collecte des données de patients

FIRENDO encourage ses centres maladies rares membres à collecter les données de leurs patients, à renseigner la base de données maladies rares (BNDMR), pour favoriser, malgré le faible nombre de patients atteints, l'étude des maladies rares.

PLAN

Amphithéâtre Luton, Faculté de Médecine, site Cochin, Université de Paris 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris



ACCUEIL

DISTRIBUTION DES PLATEAUX REPAS

 Hall du bâtiment de la Faculté de Médecine

CONFÉRENCES

 Amphithéâtre Luton



Pour twitter sur cet événement, un hashtag :

#ColloqueRechercheFIRENDO



HÔPITAL COCHIN

27, rue du Faubourg Saint-Jacques
75014 Paris

Email : contact@firendo.fr

Site Internet : www.firendo.fr