

La recherche génétique dans l'anémie de Diamond-Blackfan

Pierre-Emmanuel Gleizes

Centre de Biologie Intégrative, Toulouse

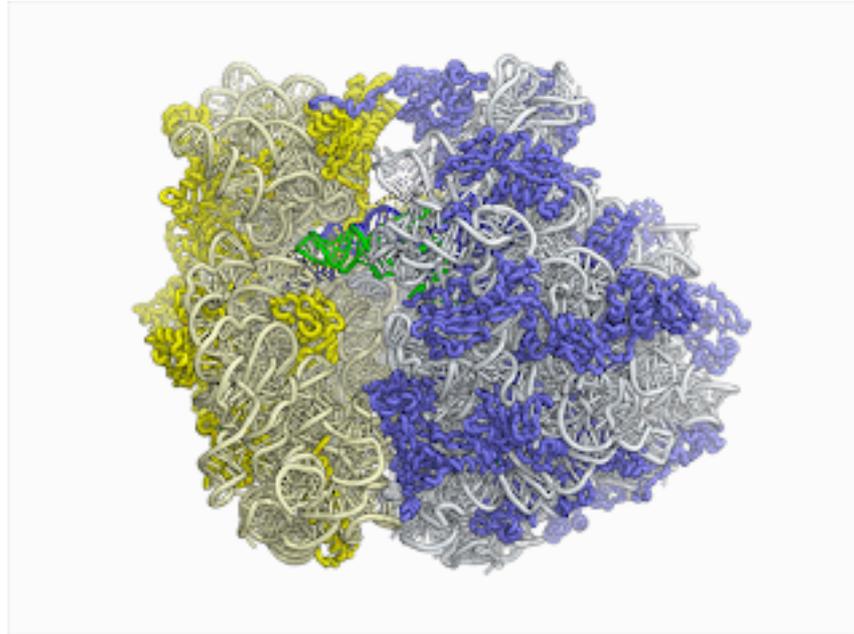
Rencontre des familles de l'AFMBD
23 octobre 2016, Bordeaux



Bientôt 20 ans...

- 1999 : découverte d'une mutation dans le gène RPS19 chez une patiente en Suède présentant une translocation chromosomique.
 - Le séquençage de RPS19 chez d'autres patients montre que ce gène est muté dans 25-30% des cas
- 2006 : le séquençage systématique des gènes de protéines ribosomiques fait apparaître des mutations dans RPS24.
 - Le lien avec les ribosomes est clairement établi
- 2016 : 16-18 gènes de protéines ribosomiques sont désormais associés à l'ADB
 - Environ 70% des patients ont une mutation dans un de ces gènes

Les ribosomes sont formés de nombreuses pièces



© Yuri Polikanov

1 ribosome humain

= une petite sous-unité + une grande sous-unité

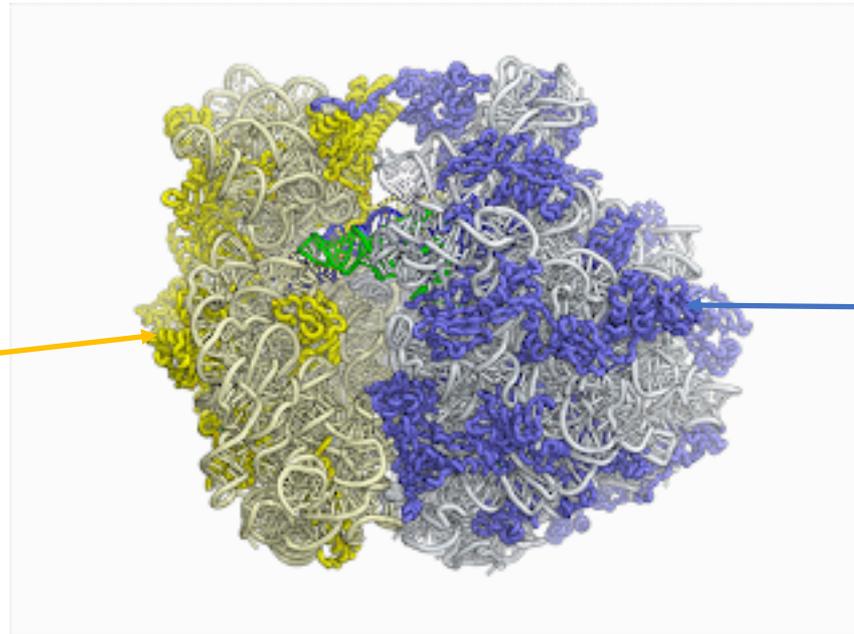
= 4 ARN (gris) + 80 protéines (jaune et bleu), soit 84 molécules

Nombre = 5 à 10 millions dans chaque cellule de notre corps

Les ribosomes sont formés de nombreuses pièces

Les éléments jaunes sont les protéines ribosomiques de la petite sous-unité ou **RPS**.

Ex: RPS19, RPS26,...



Les éléments bleus sont les protéines ribosomiques de la grande sous-unité ou **RPL**.

Ex: RPL5, RPL11,...

Les ribosomes assurent la fabrication des protéines chez tous les êtres vivants





15 SOURCES DE PROTÉINES À PETITS PRIX.

POITRINE DE POULET/DINDE 25G DE PROTÉINES POUR 100G	OEUF (BLANCS D'OEUF) 7G DE PROTÉINES/OEUF (58G)	BEURRE DE PEANUTS 25G DE PROTÉINES POUR 100G	CHEVAL HACHÉ 21G DE PROTÉINES POUR 100G	HARICOTS ROUGES SECS 30G DE PROTÉINES POUR 100G
 25z	 12z	 25z	 21z	 30z
THON LOW SODIUM (CONSERVE) 16G DE PROTÉINES PAR CONSERVE (60G)	FROMAGE COTTAGE 15G DE PROTÉINES POUR 125G	YOGOURT GREC LIBERTÉ 0% 18G DE PROTÉINES PAR 175G	P'TIT QUÉBEC MOZZARELLA PARTIELLEMENT ÉCRÉMÉ 8G DE PROTÉINES PAR 30G	PROTÉINE EN POUDRE 22G PROTÉINES PAR PORTION (25G)
 27z	 12z	 10z	 27z	 88z
PÂTES 10G PROTÉINES POUR 75G	PORC MAIGRE 18G PROTÉINES POUR 100G	LAIT 1-2% 9G PROTÉINES POUR 250ML	QUINOA (+SOYA, GRUAU...) 13G PROTÉINES POUR 100G	FILET DE SAUMON/SOLE 21G PROTÉINES POUR 100G
 13z	 18z	 4z	 13z	 21z

JULIENBRAIDA.COM. LIBRE DE DROITS. PROGRAMME PERTE DE POIDS ET REMISE EN FORME **HARDCORPS 1.0.**

Nous consommons des protéines dans notre alimentation, mais chacune de nos cellules doit aussi en produire grâce aux ribosomes

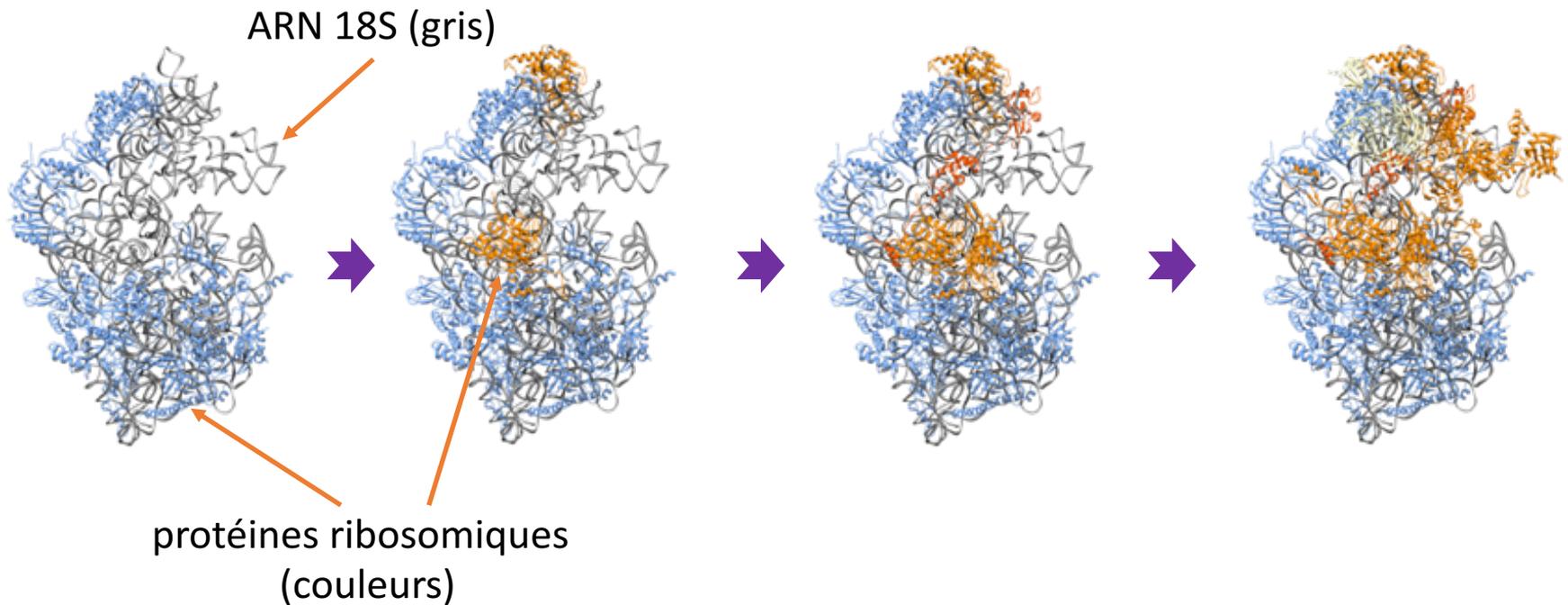
La formation des ribosomes ressemble à la fabrication de ce petit bijou

ARNr qui doit être coupé et replié

Protéines ribosomiques (RPL, RPS) qui s'accrochent à l'ARN

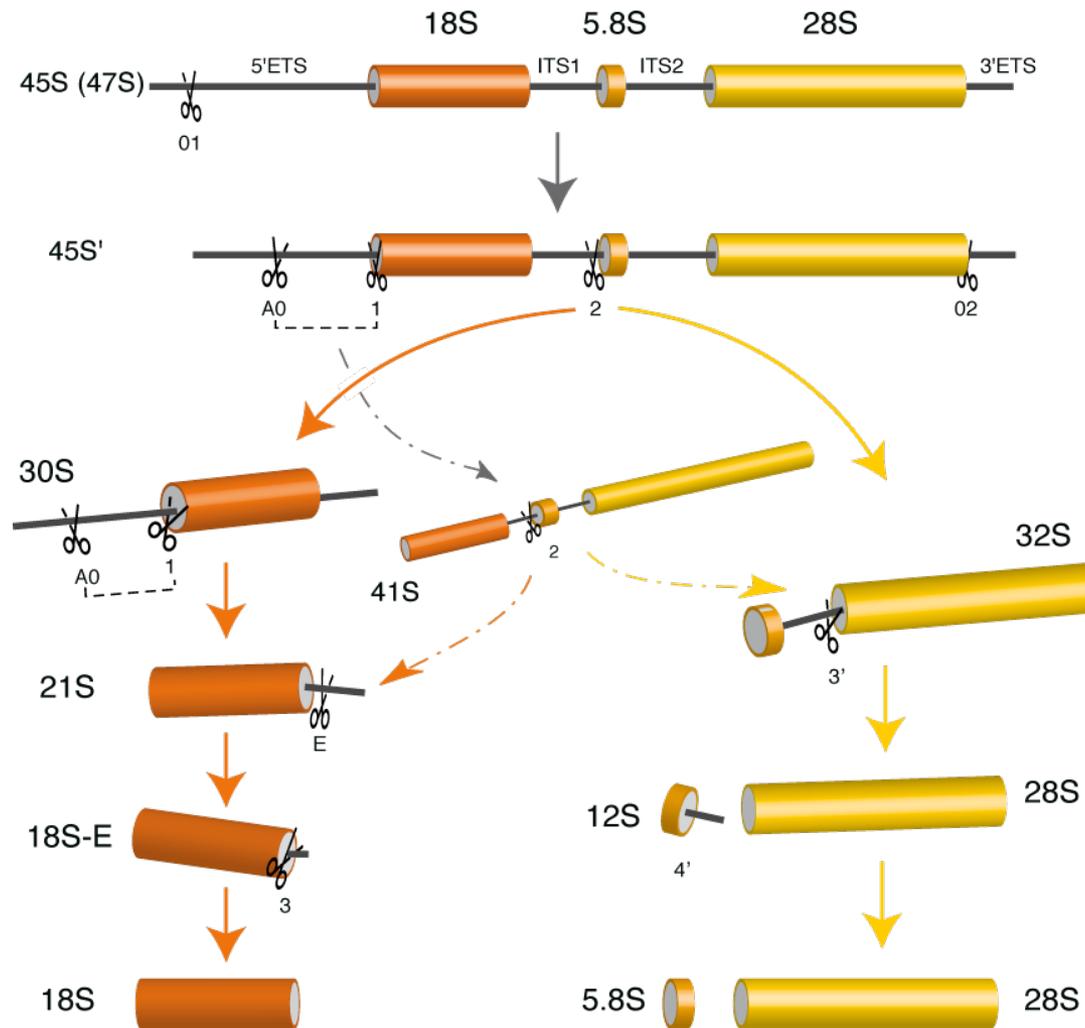


Exemple de la formation de la petite sous-unité ribosomique



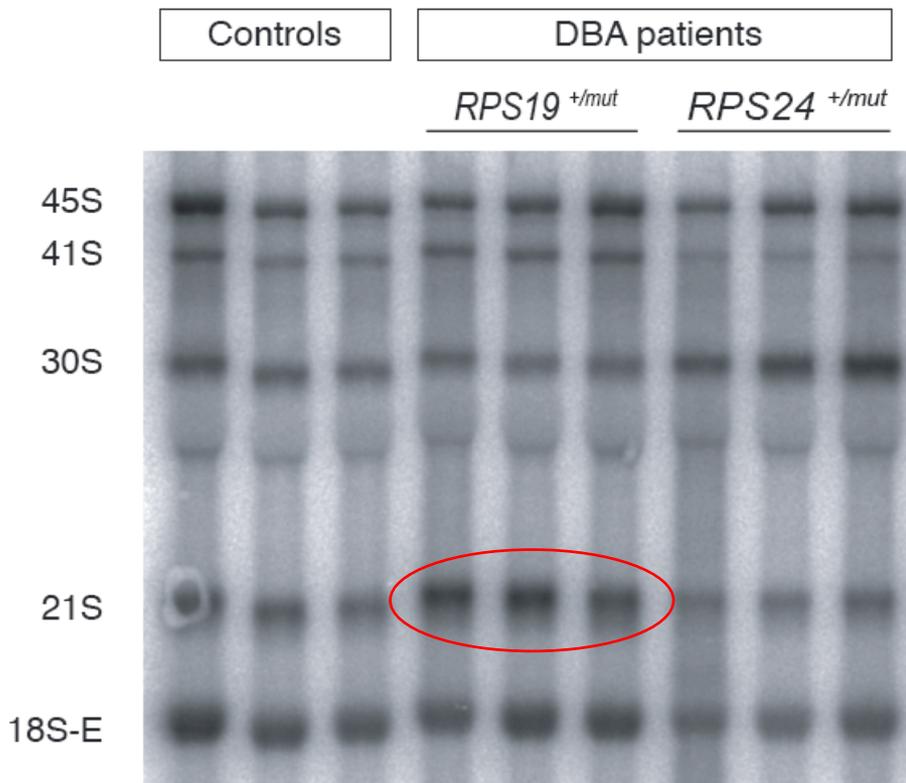
Les protéines ribosomiques s'assemblent progressivement avec l'ARN ribosomique

Formation des ARN ribosomiques humains

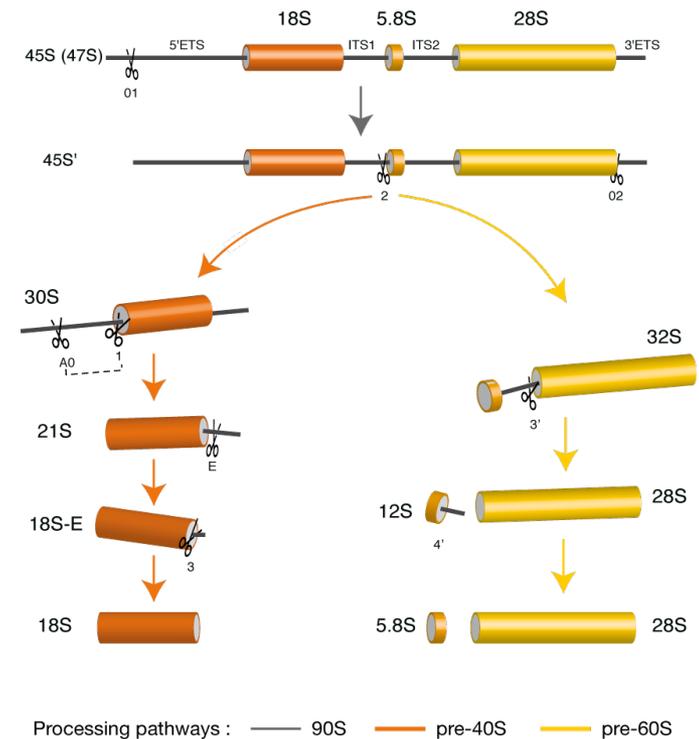


La maturation des ARN ribosomiques est altérée chez les patients DBA

L'expérience ci dessous montre les différents précurseurs de l'ARN ribosomique 18S (orange dans le schéma ci-dessous). Chaque piste verticale correspond à un individu. Les cellules des patients DBA présentent un profil de précurseurs différent des cellules d'individus contrôles. Par exemple, la mutation de RPS19 entraîne une accumulation anormale du précurseur 21S (voir dans l'ovale rouge et comparer aux pistes contrôles à gauche). Cette expérience montre que la formation des ribosome est altérée chez les patients.



lymphoblastoid cell lines



Collaboration avec le Dr. Hanna Gazda (Boston)

Conséquences d'une mutation de protéine ribosomique

Mutation d'un gène de protéine ribosomique



Insuffisance pour une protéine ribosomique



**Défaut de maturation
des ribosomes**



STRESS RIBOSOMIQUE
Arrêt de la division cellulaire
Apoptose



**Disponibilité limitée
en ribosomes fonctionnels
pour la fabrication des protéines**



**PRODUCTION DE CERTAINES
PROTEINES INSUFFISANTE OU
MAL REGULEE**

Ex : Régulateurs de la formation
des globules rouges (GATA-1),
globine...

18 gènes mutés dans l'ADB (2015)

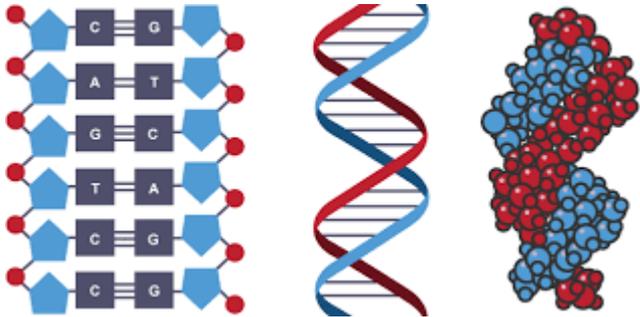
Genes mutated in DBA

Table 1. Genes mutated in DBA

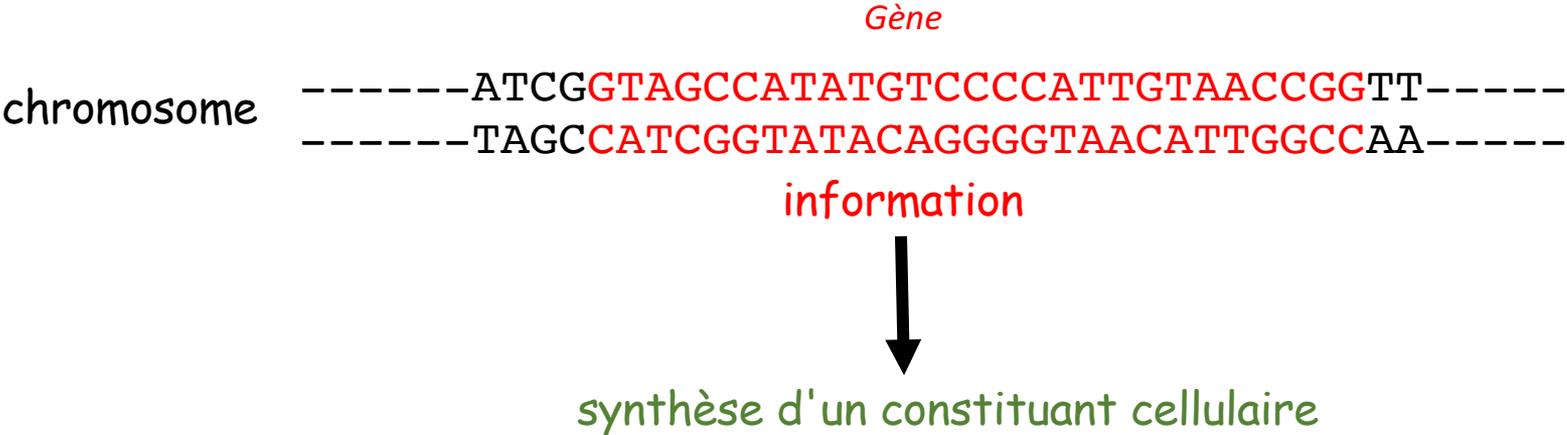
Gene	% of affected individuals	Type of mutation	References
<i>RPS19</i>	~25	Single-nucleotide variant (SNV) (missense, nonsense, splice site mutations), microinsertions, microdeletions, single copy deletions	Draptchinskaia et al., 1999; Farrar et al., 2011; Gazda et al., 2004
<i>RPL5</i>	~7	SNV (missense, nonsense, splice site mutations), microinsertions, microdeletions	Cmejla et al., 2009; Gazda et al., 2008; Quarello et al., 2012
<i>RPS26</i>	~6.5	SNV (missense and splice site mutations), microinsertions, single copy deletions	Doherty et al., 2010; Farrar et al., 2011
<i>RPL11</i>	~5	SNV (missense, nonsense, splice site mutations), microinsertions, microdeletions	Cmejla et al., 2009; Gazda et al., 2008; Quarello et al., 2012
<i>RPL35A</i>	~3	SNV (missense, nonsense, splice site mutations), microdeletion, single copy deletions	Farrar et al., 2008; Farrar et al., 2011
<i>RPS10</i>	~2.5	SNV (missense and nonsense), microinsertion	Doherty et al., 2010
<i>RPS24</i>	~2	SNV (nonsense), microinsertion/microdeletion, large deletion	Gazda et al., 2006b; Landowski et al., 2013
<i>RPS17</i>	~1	SNV (missense), microinsertion, single copy deletions	Cmejla et al., 2007; Farrar et al., 2011; Gazda et al., 2008
<i>RPS7</i>	<1	SNV (splice site mutation)	Gazda et al., 2008
<i>RPL26</i>	<1	Microdeletion	Gazda et al., 2012
<i>GATA1</i>	<1	SNV (missense, splice site mutations)	Sankaran et al., 2012
<i>RPL15</i>	<1	Large deletion	Landowski et al., 2013
<i>RPS29</i>	<1	SNV (missense mutations)	Mirabello et al., 2014
<i>RPS28</i>	<1	SNV (missense mutations)	Gripp et al., 2014
TSR2	<1	SNV (missense mutation)	Gripp et al., 2014
<i>RPL31</i>	<1	Single copy deletion	Farrar et al., 2014
<i>RPS27</i>	<1	Microdeletion	Wang et al., 2015
<i>RPL27</i>	<1	SNV (splice site mutation)	Wang et al., 2015

Genes ordered according to the percentage of DBA-affected individuals who carry a certain mutation. RPL, RP from large ribosomal subunit; RPS, RP from small ribosomal subunit.

Qu'est-ce qu'un gène muté?

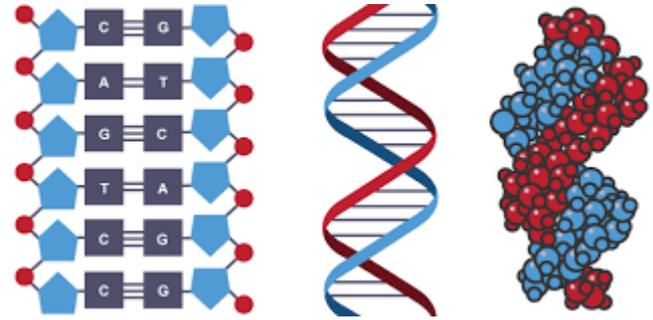


3 représentations de l'ADN, qui compose les chromosomes



Un gène est une portion de l'ADN qui contient l'information nécessaire à la synthèse d'un constituant cellulaire (ARN, protéine)

Qu'est-ce qu'un gène muté?



3 représentations de l'ADN, qui compose les chromosomes.

Gène

chromosome

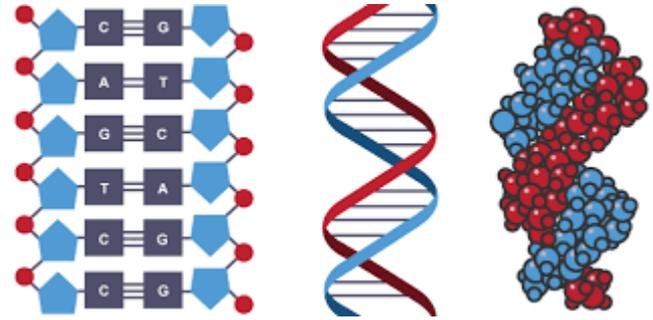
-----ATCG**GTAGCCATATGTCCCCATTGTAACCGG**TT-----
-----TAGC**CATCGGTATACAGGGGTAACATTGGCCAA**-----

chromosome

-----ATCG**GTAGCCATATGTCCCCATTGTAACCGG**TT-----
-----TAGC**CATCGGTATACAGGGGTAACATTGGCCAA**-----

La plupart des gènes sont présents dans le génome en deux exemplaires, portés par une paire de chromosomes homologues (l'un vient du père, l'autre de la mère). Dans la DBA, un seul des deux gènes est muté (modifié), l'autre est normal

Qu'est-ce qu'un gène muté?



3 représentations de l'ADN, qui compose les chromosomes

Gène

chromosome

-----ATCGGTAGCCATATGTCCCCATTGTAACCGGTT-----
-----TAGCCATCGGTATACAGGGGTAACATTGGCCAA-----

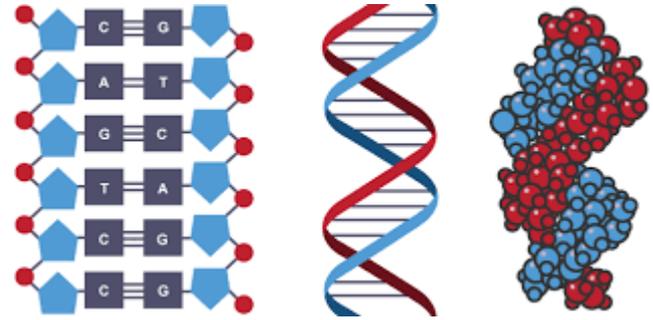
chromosome

-----ATCGGTAGCCACATGTCCCCATTGTAACCGGTT-----
-----TAGCCATCGGTGTACAGGGGTAACATTGGCCAA-----

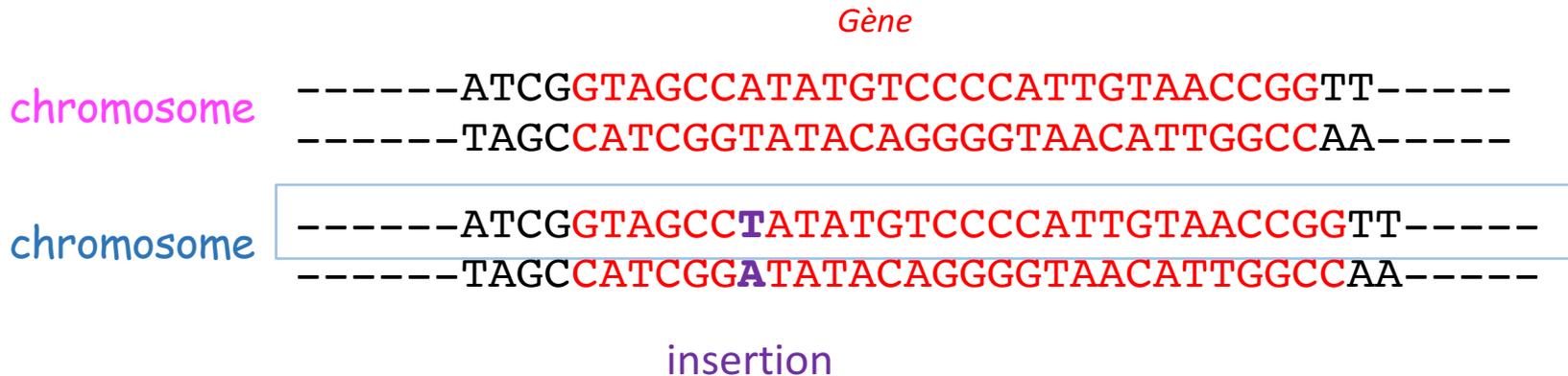
substitution

Une substitution correspond au remplacement d'une des lettres, ce qui peut changer le sens de l'information portée par le gène

Qu'est-ce qu'un gène muté?

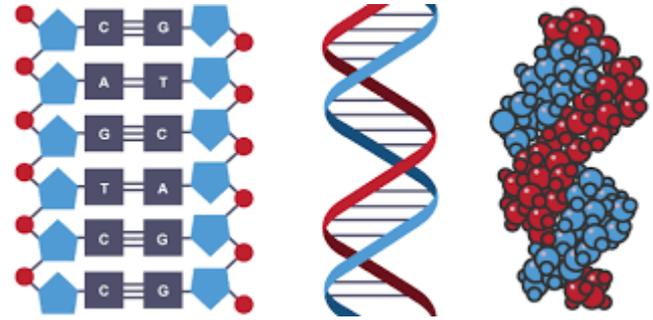


3 représentations de l'ADN, qui compose les chromosomes



L'insertion d'une lettre dans un gène décale la lecture de l'information qu'il contient et lui fait perdre son sens

Qu'est-ce qu'un gène muté?



3 représentations de l'ADN, qui compose les chromosomes

Gène

chromosome

-----ATCGGTAGCCATATGTCCCCATTGTAACCGGTT-----
-----TAGCCATCGGTATACAGGGGTAACATTGGCCAA-----

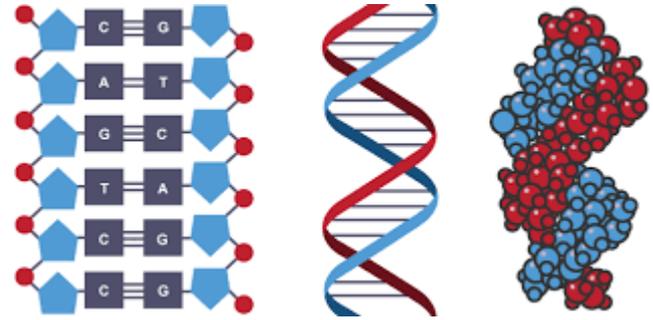
chromosome

-----ATCGGTAGCC . TATGTCCCCATTGTAACCGGTT-----
-----TAGCCATCGG . ATACAGGGGTAACATTGGCCAA-----

délétion

La perte d'une seule lettre est suffisante pour décaler la lecture de l'information (comme pour une insertion) et lui faire perdre son sens

Qu'est-ce qu'un gène muté?



3 représentations de l'ADN, qui compose les chromosomes



Dans certains cas, la perte d'un long segment du gène est observée. Ces grandes délétions sont difficiles à détecter par séquençage.

Pourquoi rechercher les mutations?

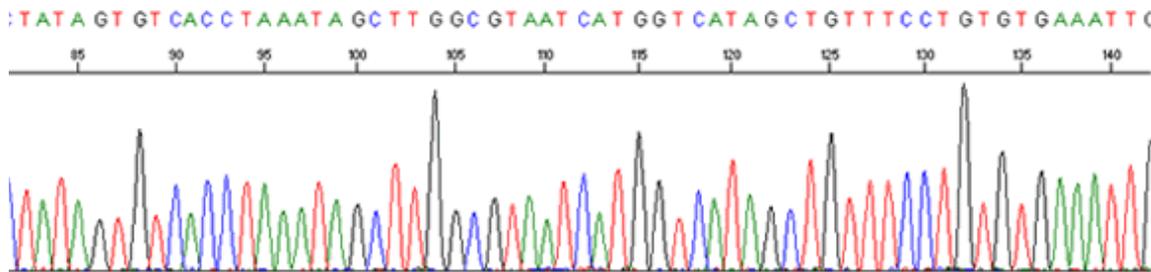
- **Comprendre les mécanismes de la maladie**
 - L'identification des gènes mutés indique quels sont les constituants cellulaires qui font défaut.
- **Confirmer le diagnostic**
 - Le patient peut recevoir le bon traitement
- **Identifier les porteurs silencieux de la mutation dans une famille**
 - Essentiel pour choisir un donneur pour une greffe : il faut être sûr que le donneur ne porte pas une mutation sans être malade
 - Nécessaire pour vérifier si un des parents est porteur de la mutation et pouvoir apporter un conseil génétique

Comment séquencer?

A – Séquençage des gènes déjà associés à la maladie

- **Méthode de Sanger**

- Séquençage gène par gène
- On commence par les gènes les plus fréquemment mutés (RPS19, RPL5, RPL11, RPS26), puis on continue avec les autres si les premiers ne sont pas mutés
- Relativement simple à mettre en oeuvre, mais assez long



Résultat d'un séquençage Sanger

- **Puces à ADN (hybridation génomique comparative)**

- Analyse d'un ensemble de gènes choisis
- Permet de détecter de longues pertes chromosomiques (délétion)

Comment séquencer?

B – Découvrir des mutations dans des gènes "inconnus"

- **Séquençage des exomes**

- Séquençage à grande échelle des parties du génome les mieux connues et considérées comme "utiles"
- Grande quantité d'information
- Coût élevé, analyse compliquée

- **Séquençage du génome entier**

- Séquençage systématique de l'ensemble du génome
- Très grande quantité d'information
- Coût encore plus élevé, analyse encore plus compliquée

Comment analyser les résultats?

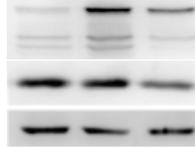
- **Cas n° 1** : la mutation détectée a déjà été caractérisée dans le cas d'un ou plusieurs autres patients DBA
 - Le génotype est établi
- **Cas n° 2** : la mutation détectée est dans un gène déjà associé à la maladie, mais n'a jamais été observée chez d'autres patients
 - Il est nécessaire de caractériser l'impact biologique de cette mutation pour savoir si elle est vraiment à l'origine de la maladie : il n'existe pas de test en routine pour faire cela. Il s'agit d'un travail de recherche.
- **Cas n° 3** : il n'y a pas de mutation dans un des gènes déjà associés à la maladie, mais des mutations sont détectées dans d'autres gènes
 - Plusieurs mutations sont souvent détectées en parallèle
 - Il faut déterminer quelles mutations sont les meilleures candidates
 - Il faut caractériser l'impact biologique des mutations les plus significatives : il s'agit d'un véritable projet de recherche qui peut prendre plusieurs années et demande un budget conséquent. Il peut aboutir à l'identification d'un nouveau gène impliqué dans l'ADB.

BIOLOGICAL DBA RESEARCH

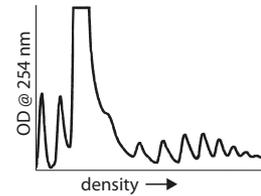
Zebrafish models



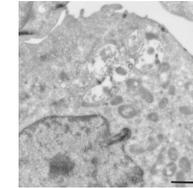
Apoptosis/autophagy western blotting



Polysome profiling



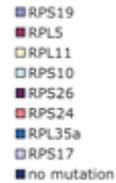
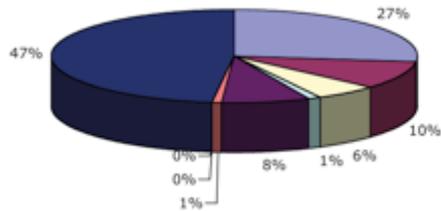
Electron microscopy



Red cell cultures

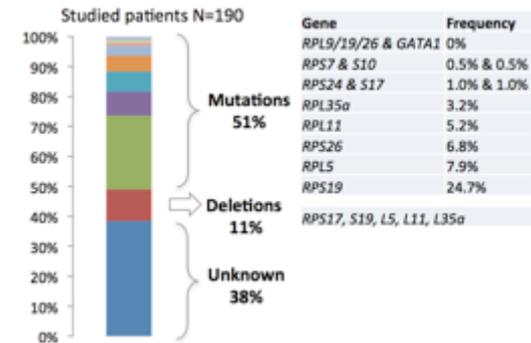


Immortalized cell lines



French DBA Registry

German/Austrian DBA Registry



CLINICAL DBA RESEARCH



EuroDBA 2015-2018



NL
MacInnes
Amsterdam

Coordinator Profiling/OMICs
Zebrafish
Novel Dx



FR
Gleizes
Toulouse

rRNA analysis
Novel Dx

www.eurodba.eu



DE
Wlodarski
Freiburg

B/T cell cultures
Phenotype +Dx



FR
Da Costa
Paris

RBC cultures
Phenotype +Dx



IT
Dianzani
Novarra

Mutation DB
Phenotype +Dx



PL
Albrecht
Warsaw

Registry
Biobanking



TR
Unal
Ankara

MSC cultures
Registry
Biobanking



IL
Tamary
Petah Tikva

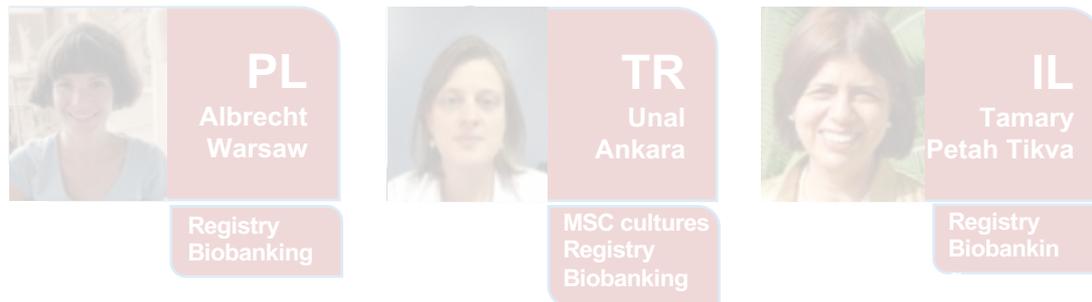
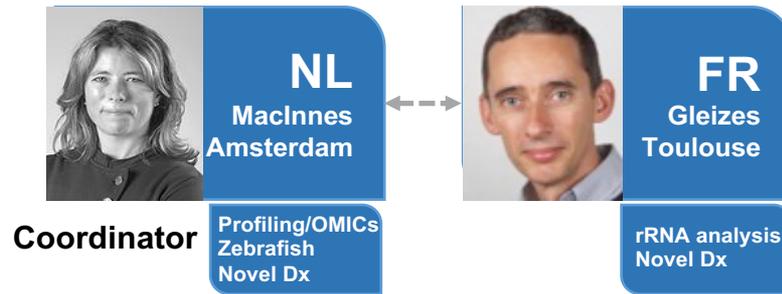
Registry
Biobankin

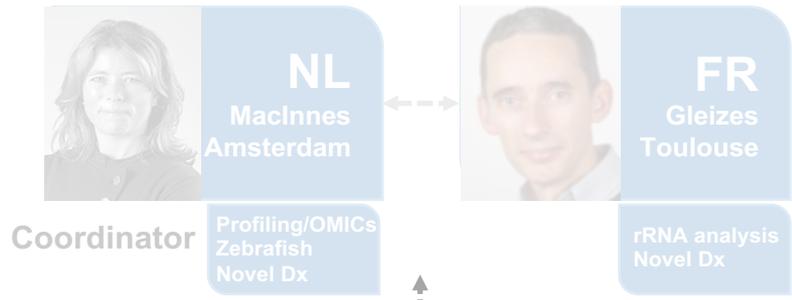
Un nouveau réseau européen (et un peu au-delà) pour améliorer la recherche, le diagnostic et la prise en charge de la maladie, et fédérer les registres de patients pour favoriser la recherche clinique



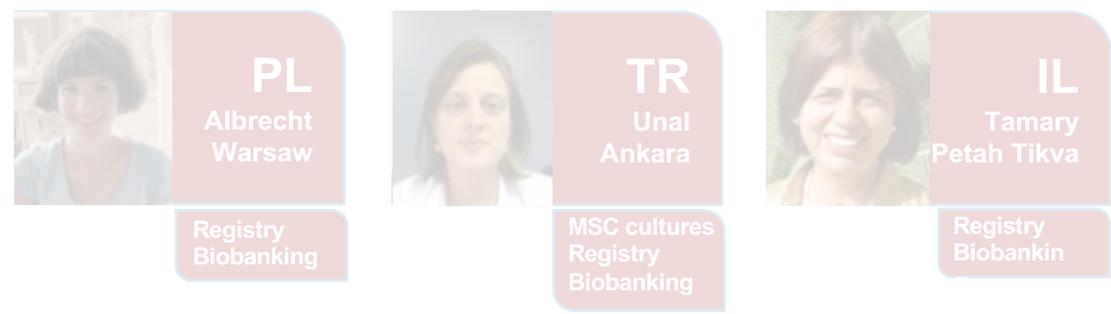
Functional platform:

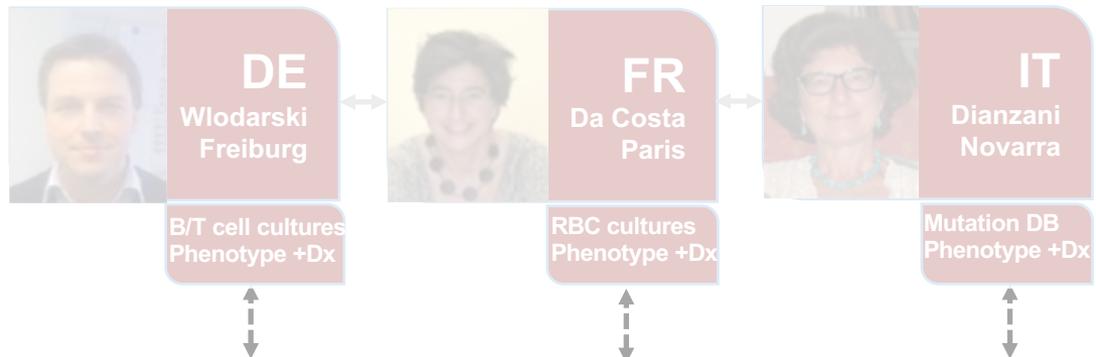
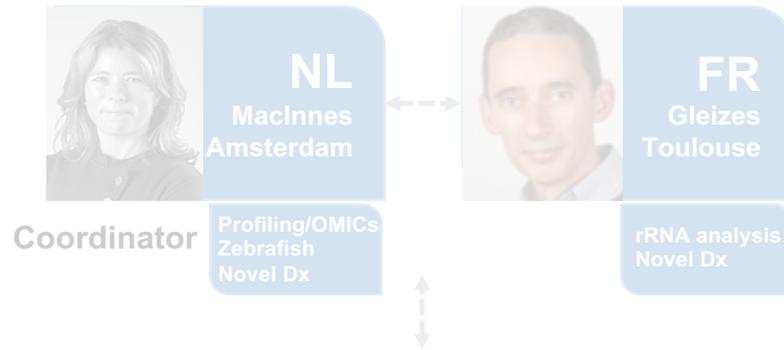
Functional validation, biological profiling, novel diagnostics



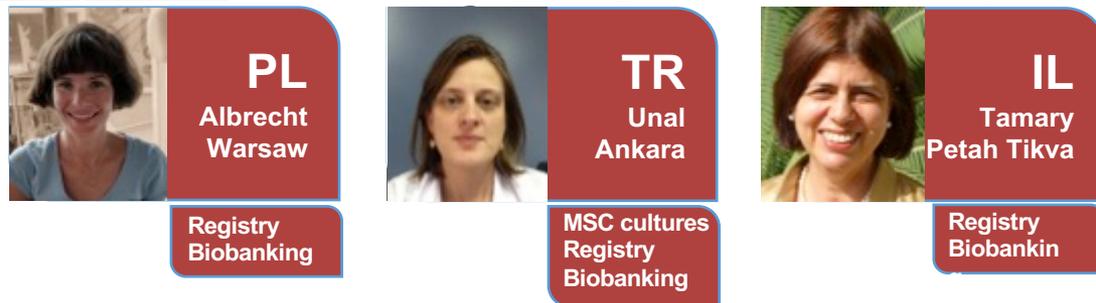


Genetic and clinical research: extended clinical and molecular characterization, prognostication, harmonization of NGS-diagnostics and mutation database





Associate partners: initiation of national registries and biobanks, patient advocacy





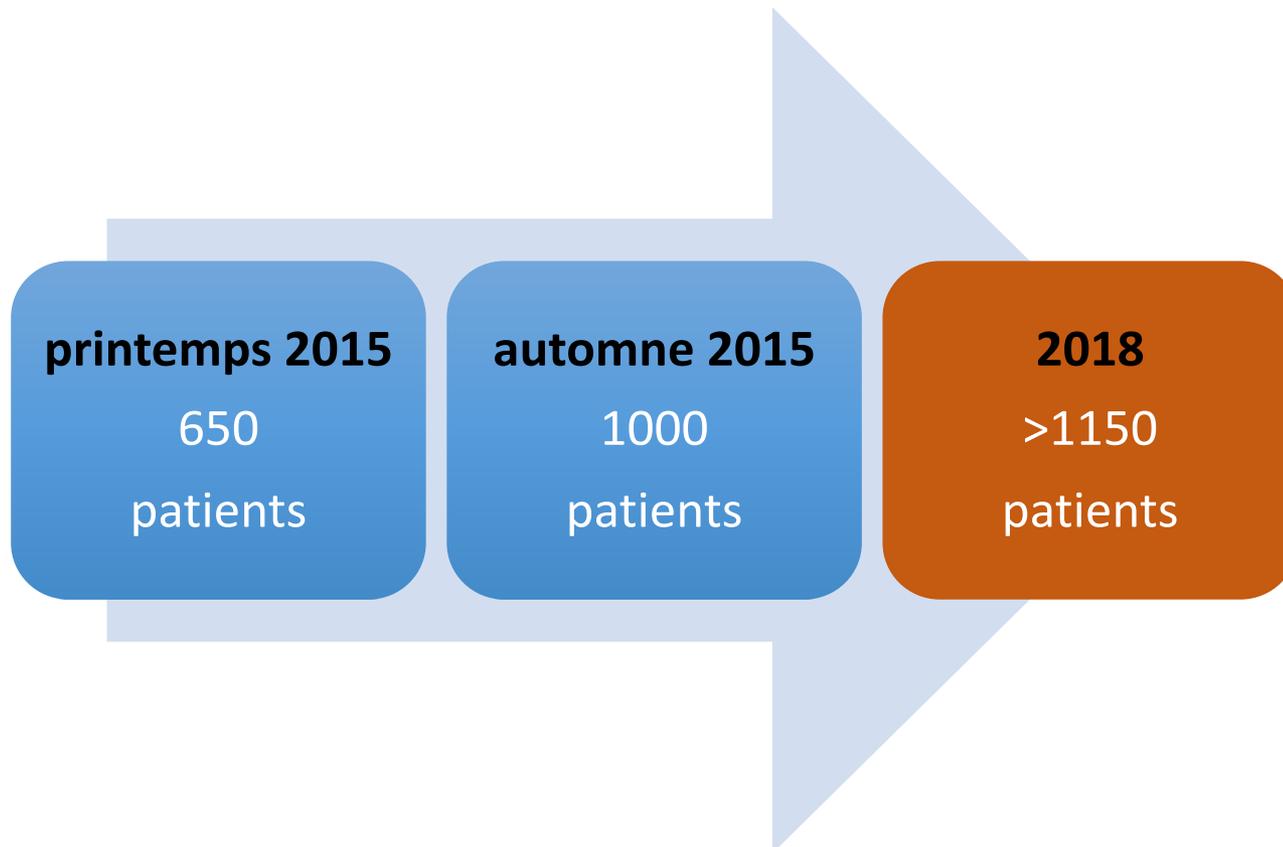
Etat du réseau euroDBA

Countries	Responsible	DBA-Registry	known patients	projected new patients / year
Initial Clinical EuroDBA investigators				
France	Leblanc/ DaCosta	yes	305	~11/year
Germany	Niemeyer/ Wlodarski	yes	304	10-12/year
Netherlands	Kuijpers/Bierings	no	5	
New EuroDBA investigators				
Israel	Hannah Tamary	yes	31	3-4/year
Italy	Ugo Ramenghi	yes	213	
Poland	Katarzyna Albrecht	no	34	~6/year
Turkey	Sule Unal	no	37	
European network				
Austria	Leo Kager	yes	17	
Czech Rep.	D. Pospisilova	yes	46	
Denmark	Birgitte Lausen	no	15	1/year
Finland	Marika Grönroos	no	7	
Greece	Antonis Kattamis	no	21	
Lithuania	Ramune Pasauliene	no	4	unkown
Norway	Jochen Büchner	no	20	1/year
Russia	Ovsyannikova	yes	75	5-7/year
Spain	Belendes	no	39	
Sweden	Niklas Dahl	no	36	1-2/year
Switzzlerland	Markus Schmutge	yes	21	0,5-1/year
UK	Josu de la Fuente	yes	102	
Non-EU contact points for EuroDBA				
Brasil	Adriana Seber	not yet	20	~20/year
China	Xiaofan Zhu	not yet	61	~20/year
Iran	Amir Ali Hamidieh	no	20	5/year
Lebanon	Roula Farah	yes	20	
Saudi Arabia	Mahasen Saleh	no	28	
South Korea	Hoon Kook	not yet	70	5/year
USA	Adriana Vlachos	yes	720	20-40/year
SUM ALL			2271	



Registre européen des patients DBA

L'objectif est de regrouper les registres cliniques de plusieurs pays européens afin de mener une recherche clinique sur un nombre de cas suffisamment élevé et obtenir ainsi des résultats scientifiquement solides (significatifs sur le plan statistique). Les registres de patients sont très importants!

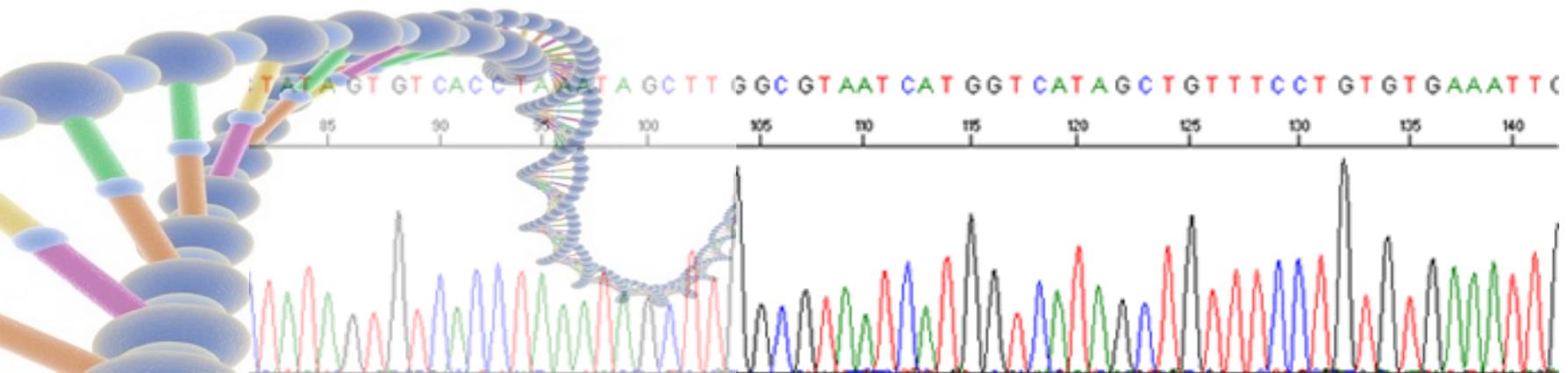




Séquençage 2012-2015

Dans une première version plus réduite entre 2012 et 2015, le réseau EuroDBA a permis plusieurs avancées en matière de séquençage :

- Séquençage (Sanger, exomes, génome complet) de 370 patients
- Découverte de nouvelles protéines ribosomiques mutées
- Découverte de mutations dans un nouveau gène non-ribosomique





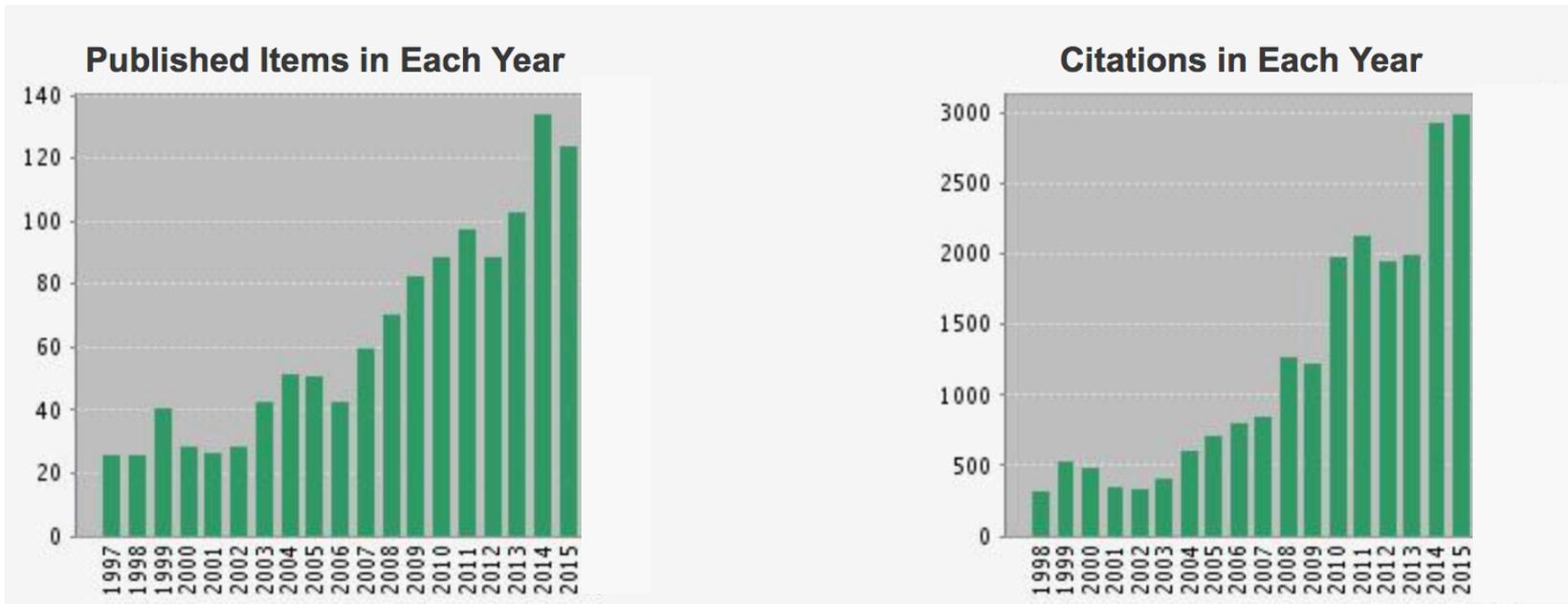
DBA International Consensus Conference 2016 – Atlanta

(pour lire un compte-rendu en anglais : dbafoundation.org/research/icc/)



- Découverte de nouveaux gènes mutés : RPL17, RPS15A
- De nouvelles pistes thérapeutiques :
 - Recherche de molécules interférant avec le mécanisme pathologique de la DBA
 - Identification d'un médicament permettant de potentialiser l'effet des corticoïdes, ce qui permettrait d'abaisser la dose de corticoïdes
 - Thérapie génique : nouvelles pistes ouvertes par le système CRISPR-CAS9, des "ciseaux moléculaires" qui pourraient être utilisés pour réparer les mutations (nombreuses mises au point encore nécessaires).

La recherche sur la DBA avance...



Nombre de publications scientifiques traitant de la DBA au fil des ans

Nombre de citations des publications scientifiques traitant de la DBA dans la littérature scientifique



Centre de Biologie Intégrative Université de Toulouse / CNRS

Equipe P-E Gleizes

Marie-Françoise O'Donohue

Nathalie Montel-Lehri

Léo Gagliardi

Equipe P Blader

Pascale Dufourcq



Collaborations

Lydie Da Costa, Thierry Leblanc, Hopital Robert Debré, Paris

Hanna Gazda, Children's Hospital Boston

Alyson MacInnes, Marcin Wlodarski, EuroDBA



www.eurodba.eu

