



*** Mouvements miroirs congénitaux :
étude génétique de 13 cas index et
profil d'expression des gènes au
cours du développement du système
nerveux central chez la souris**

Aurélie Méneret

CRICM, Unité INSERM UMRS-975, équipe du Pr Alexis Brice

Tuteurs : Christel Depienne et Emmanuel Flamand-Roze

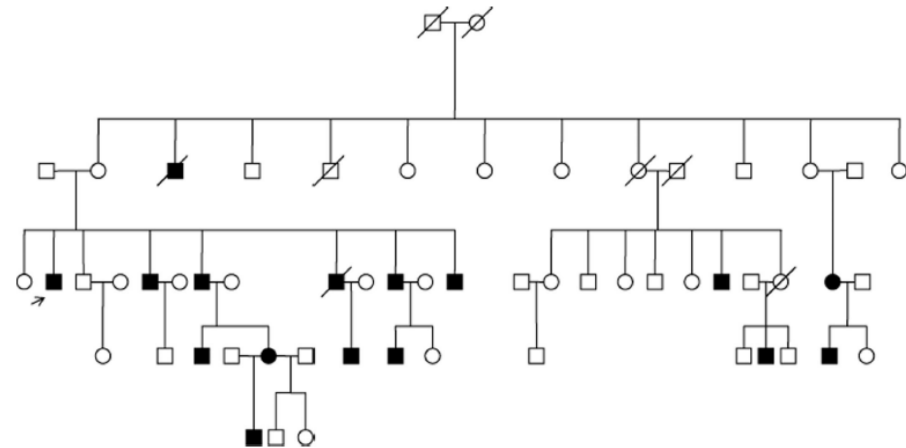
*DCC

SCIENCE

Mutations in *DCC* Cause Congenital Mirror Movements

Myriam Srour,^{1*} Jean-Baptiste Rivière,^{1*} Jessica M. T. Pham,² Marie-Pierre Dubé,^{1,3} Simon Girard,¹ Steves Morin,² Patrick A. Dion,¹ Géraldine Asselin,³ Daniel Rochefort,¹ Pascale Hince,¹ Sabrina Diab,¹ Naser Sharafaddinzadeh,⁴ Sylvain Chouinard,¹ Hugo Théoret,⁵ Frédéric Charron,² Guy A. Rouleau^{1†}

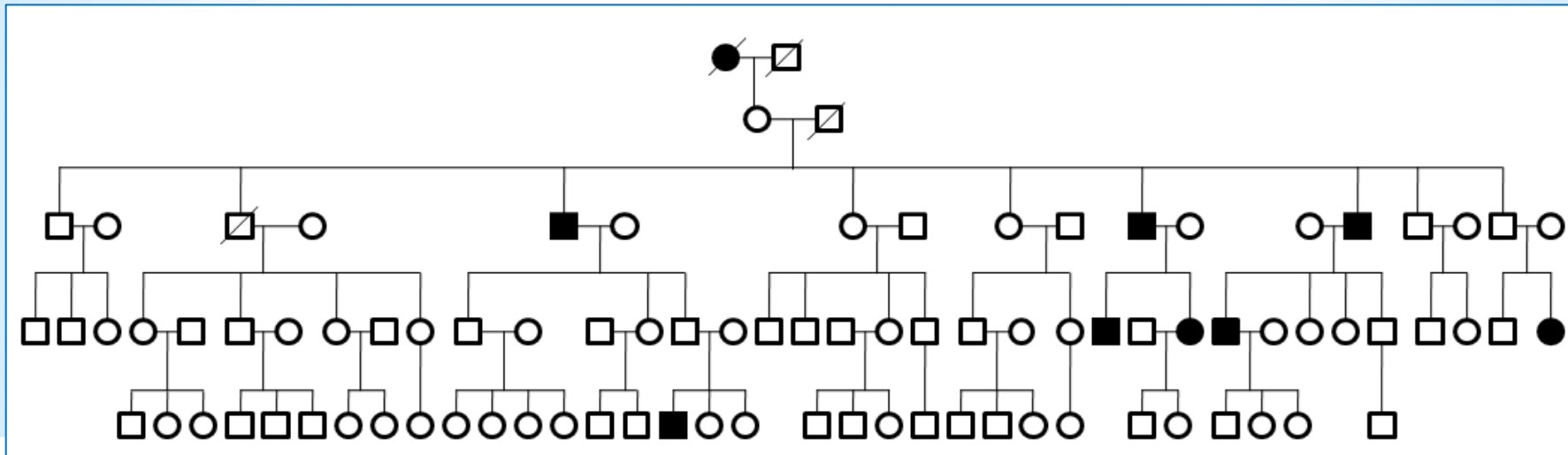
Mirror movements (MM) are contralateral involuntary movements that mirror voluntary ones. MM are occasionally found in young children, but persistence beyond age 10 is unusual except in certain disorders of nervous system crossing such as Klippel-Feil and Kallmann syndrome. The study of individuals with MM can provide important insights into the mechanisms of contralateral innervation.



- DCC (deleted in colorectal cancer)
- Récepteur de la netrin-1
- Impliqué dans l'attraction et le guidage axonal à travers la ligne médiane
- Souris *DCC Kanga*: mouvements miroirs dus à un déficit de décussation du faisceau cortico-spinal et une absence de corps calleux (Finger et al., 2002)



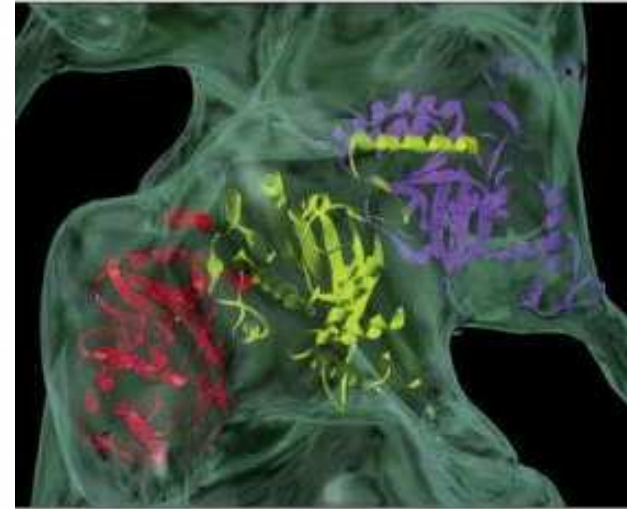
* Identification de *RAD51*



- Cartographie génétique \Rightarrow liaison à un seul locus sur le chromosome 15
- Analyse de l'exome \Rightarrow Identification d'une mutation non-sens dans *RAD51*
- Identification d'une autre mutation tronquante dans une 2^e famille

\Rightarrow ***RAD51* : 2^e gène responsable de MM**

* Fonction connue de RAD51



* Réparation de l'ADN par recombinaison homologue

* Rôle cytoplasmique peu étudié: maintenance du génome mitochondrial ? (Sage et al., 2009)

* Exprimé dans la zone ventriculaire au cours du développement cortical (Ajioka et al., 2006)

➔ Nouveau rôle de RAD51 dans le développement du SNC ?

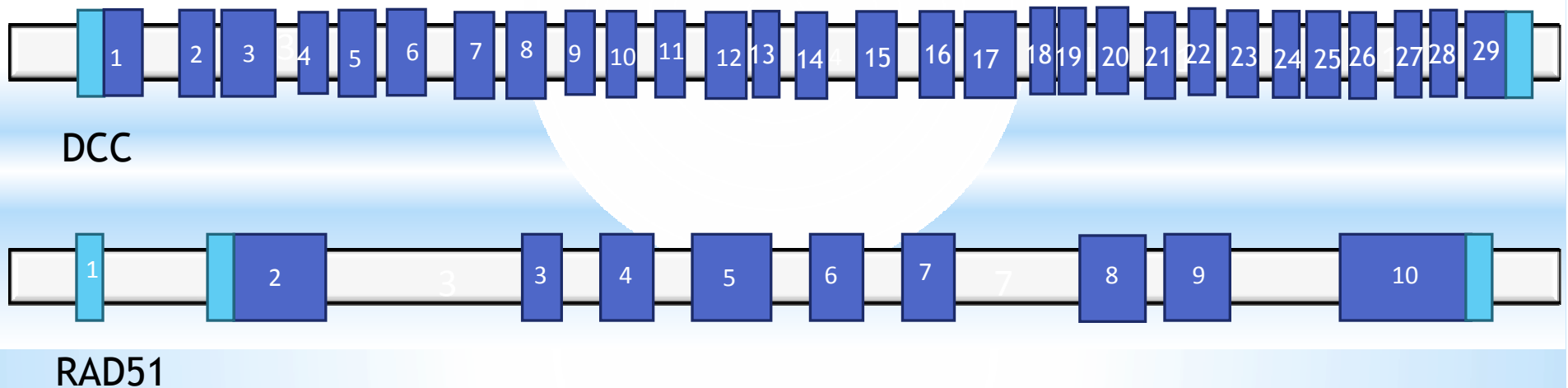
* Objectifs du projet

Etude et comparaison de la contribution de RAD51 et DCC dans la genèse des MM

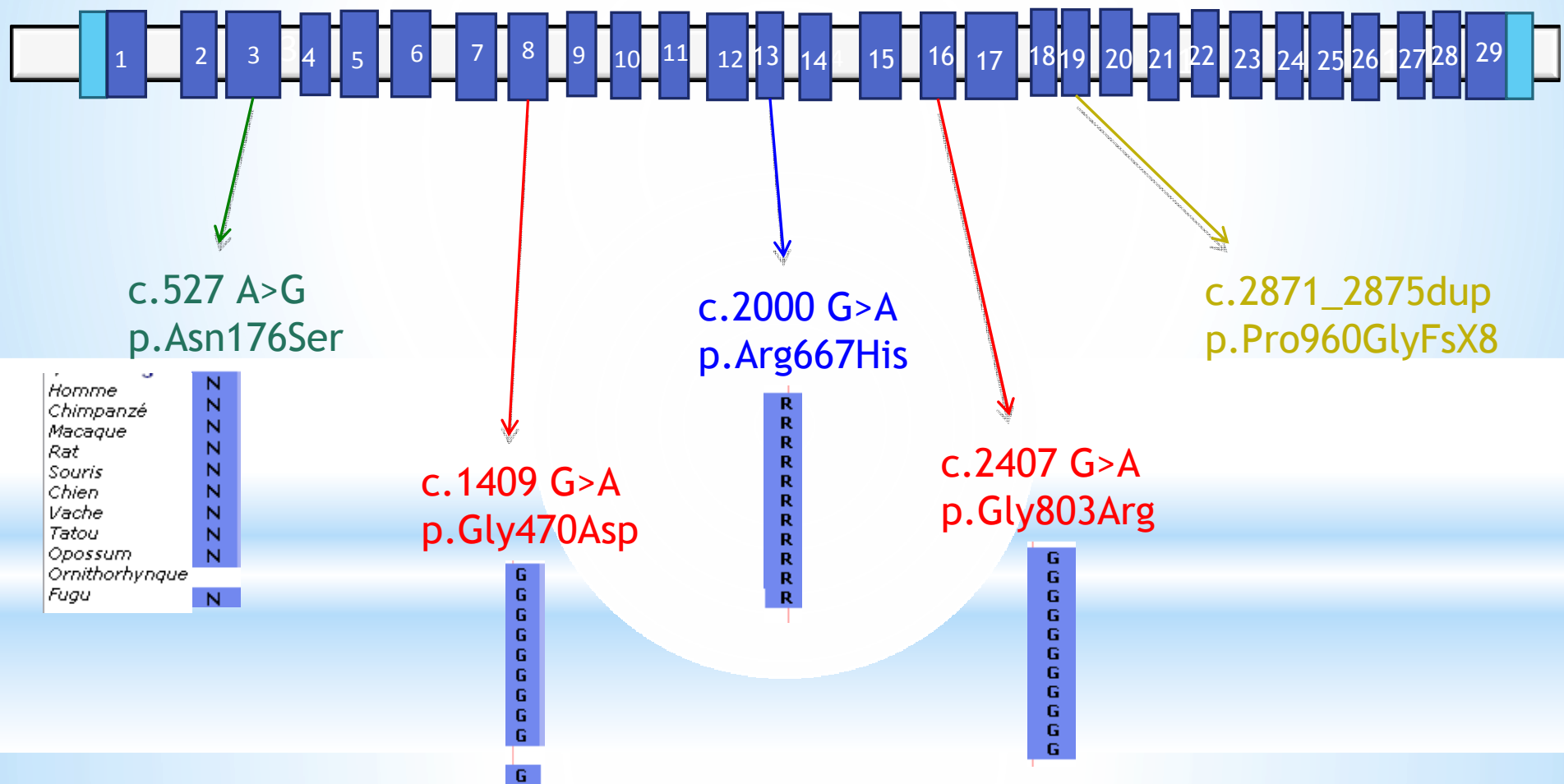
1. Rechercher des mutations de *RAD51* et *DCC* chez des cas sporadiques et familiaux
2. Préciser l'expression de *RAD51* et *DCC* au cours du développement du SNC chez la souris

*Analyses génétiques

- Patients : 11 cas sporadiques et 2 cas index de MM familiaux
- Méthodes
 - Amplification à partir de l'ADN génomique
 - Séquençage (Sanger)

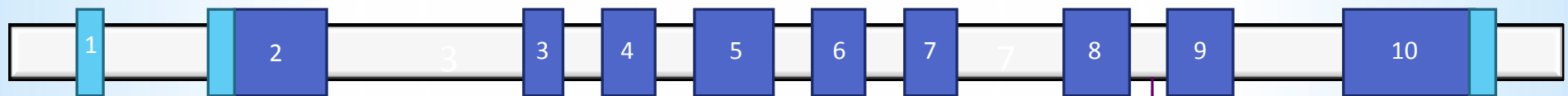


* Résultats génétiques: *DCC*



Variants absents d'une population témoin (sauf c.1409G>A et c.527A>G) et prédits comme délétères

* Résultats génétiques: *RAD51*



c.140 A>G
p.His47Arg

c.778-5 A>G

Homme
 Chimpanzé
 Macaque
 Rat
 Souris
 Chien
 Xénope
 Tétraodon
 Mouche drosophile
 C. elegans
 Levure de boulanger

H
 H
 H
 H
 H
 H
 H
 H
 Y
 H

- ✓ Absent d'une population témoin
- ✓ Prédit comme délétère

- ✓ Absent d'une population témoin
- ✓ Modifie l'épissage ?

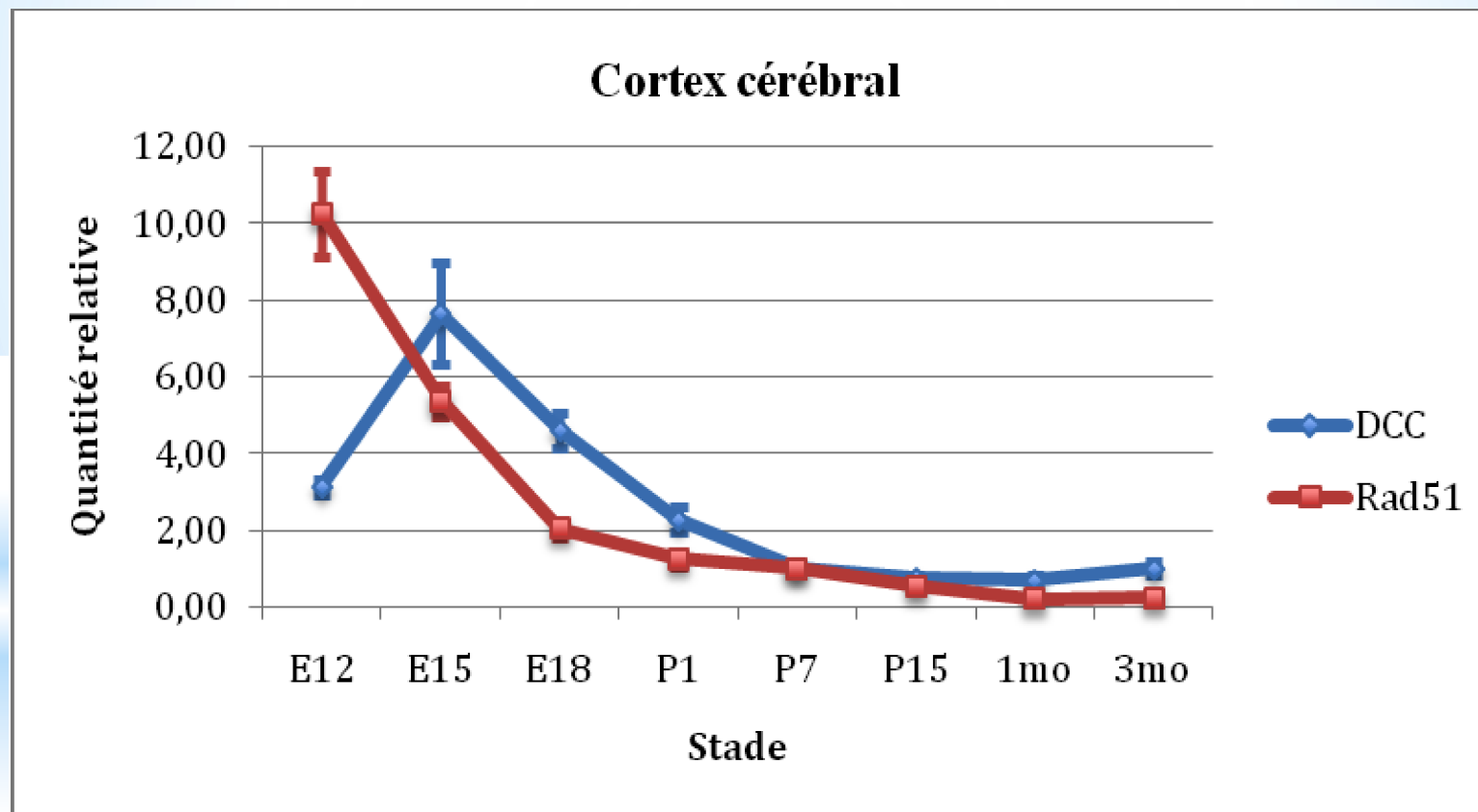
* Etudes d'expression de RAD51 et DCC chez la souris

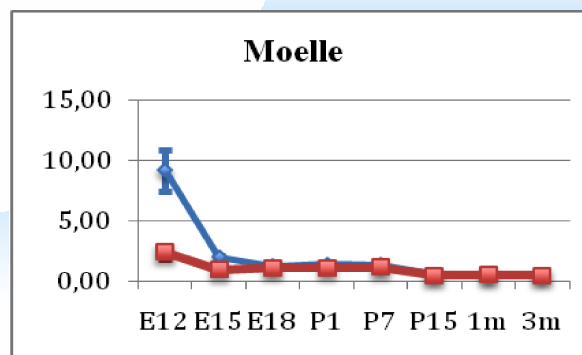
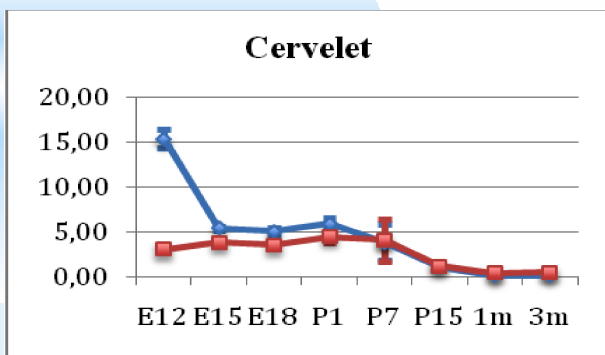
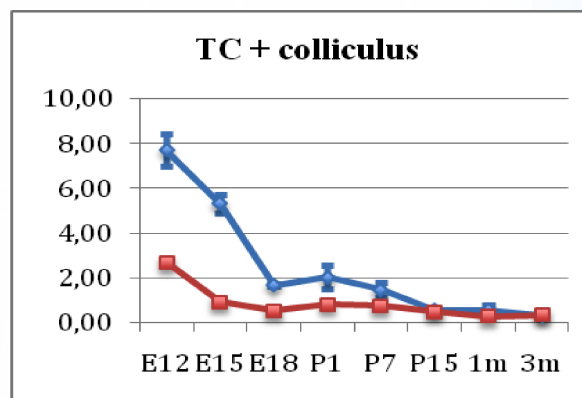
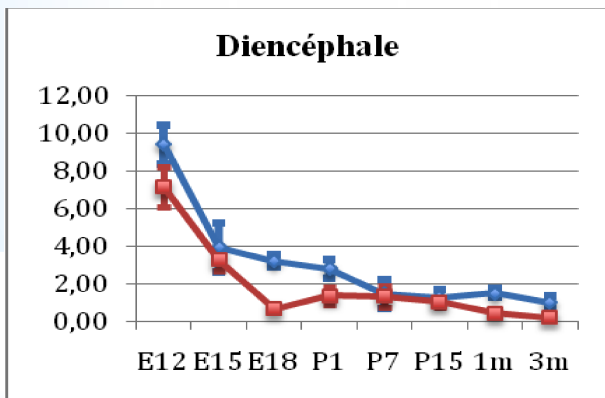
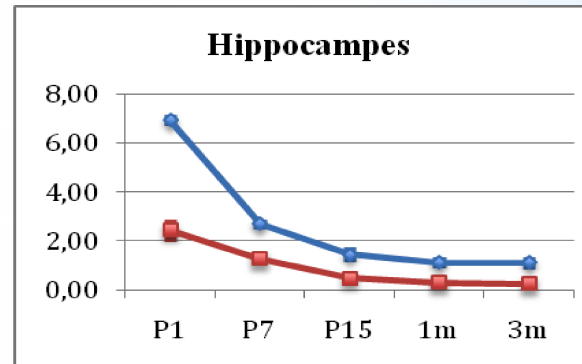
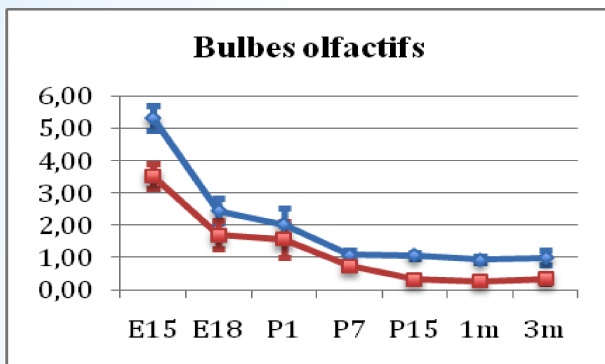
1. PCR quantitative (qPCR):

- Prélèvements de 9 tissus à 8 stades développementaux
- Extraction d'ARN
- Transcription inverse
- QPCR

2. Immunohistochimie

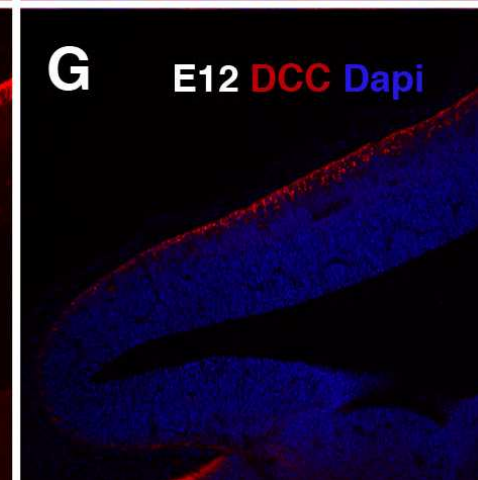
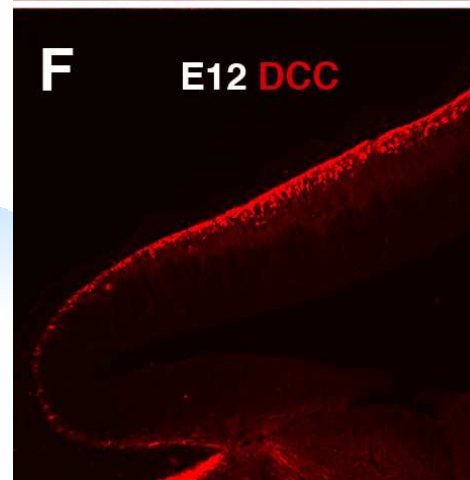
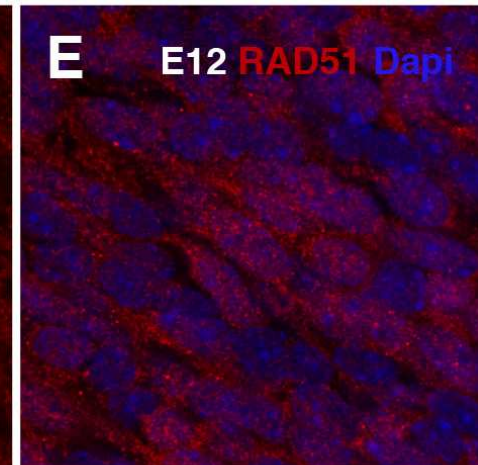
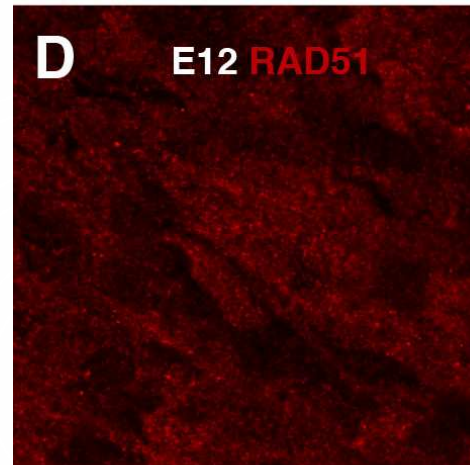
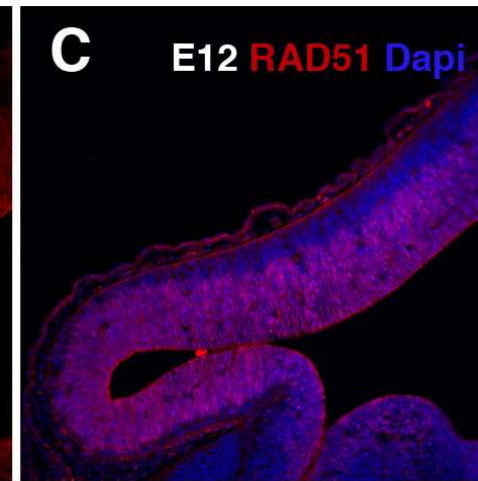
* Expression: qPCR

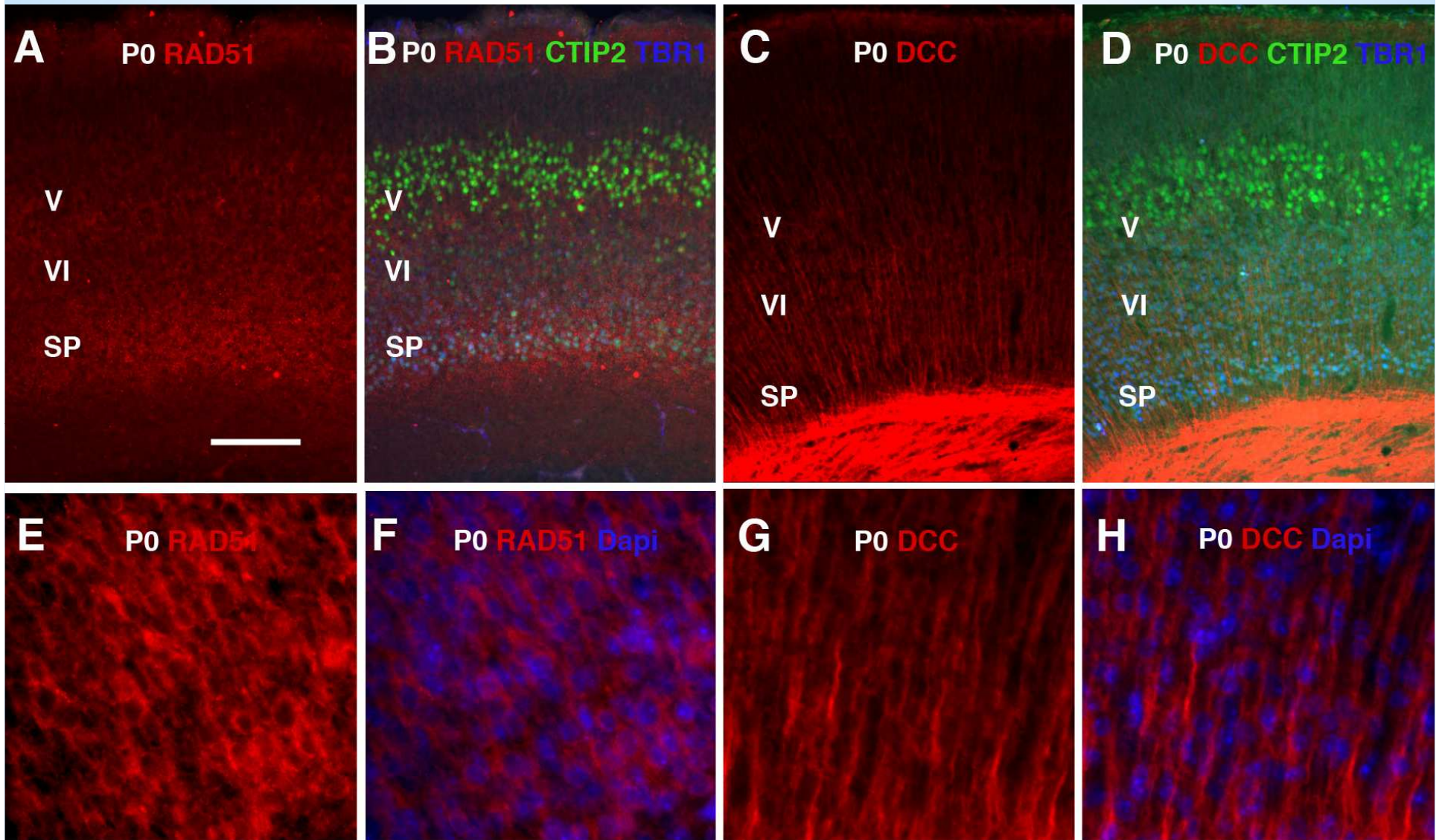




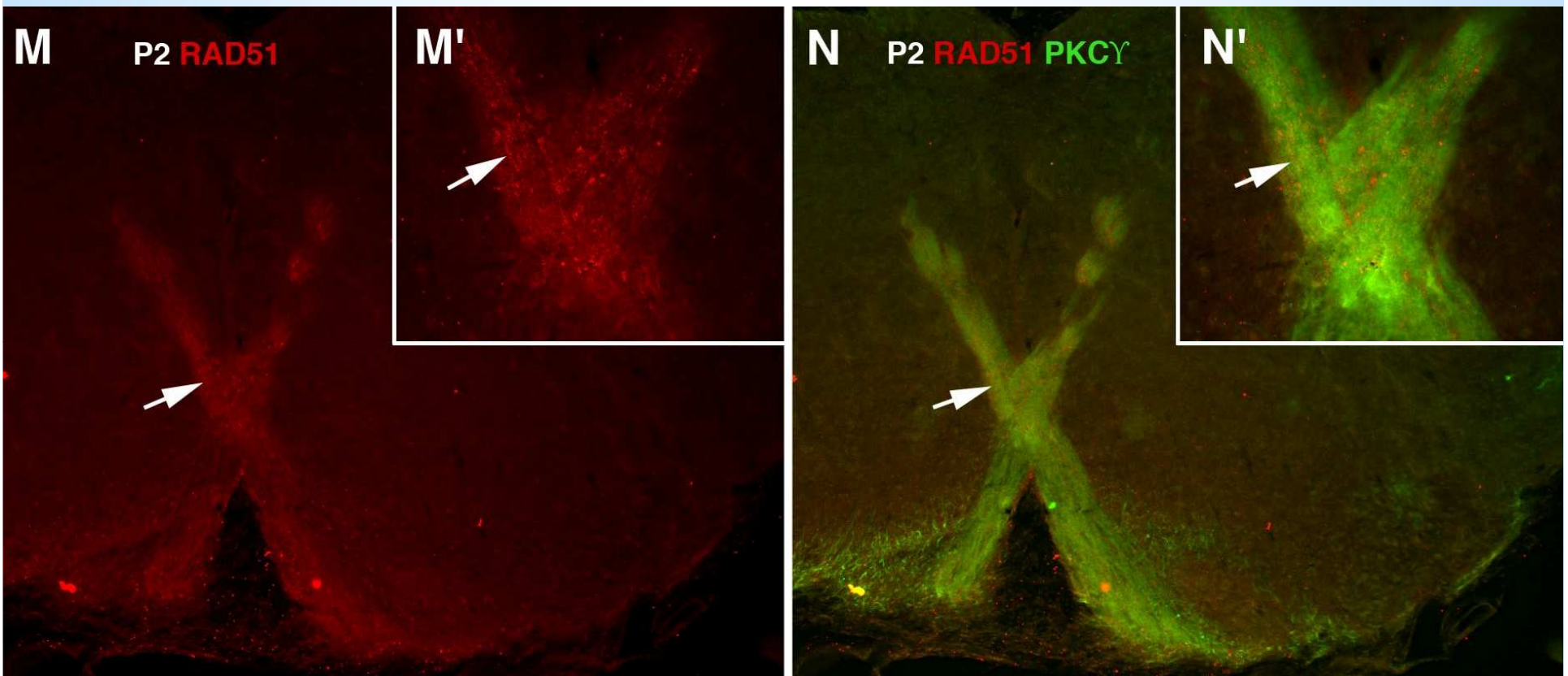
* **Expression:
immuno-
histochimie**

Sections sagittales de
néocortex de souris à
E12



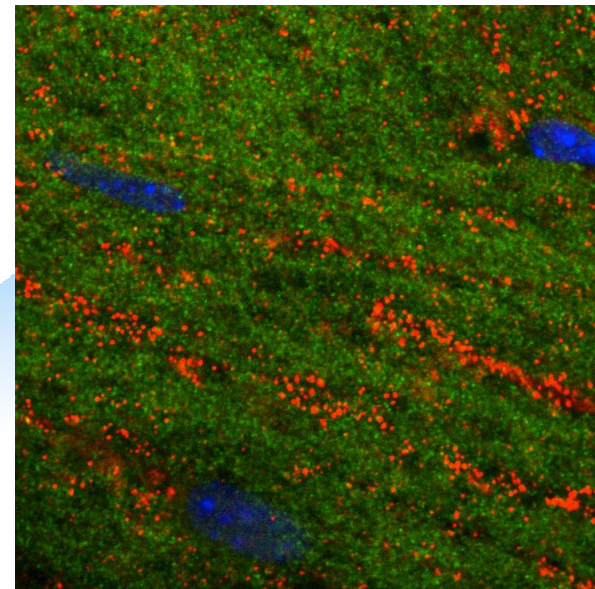


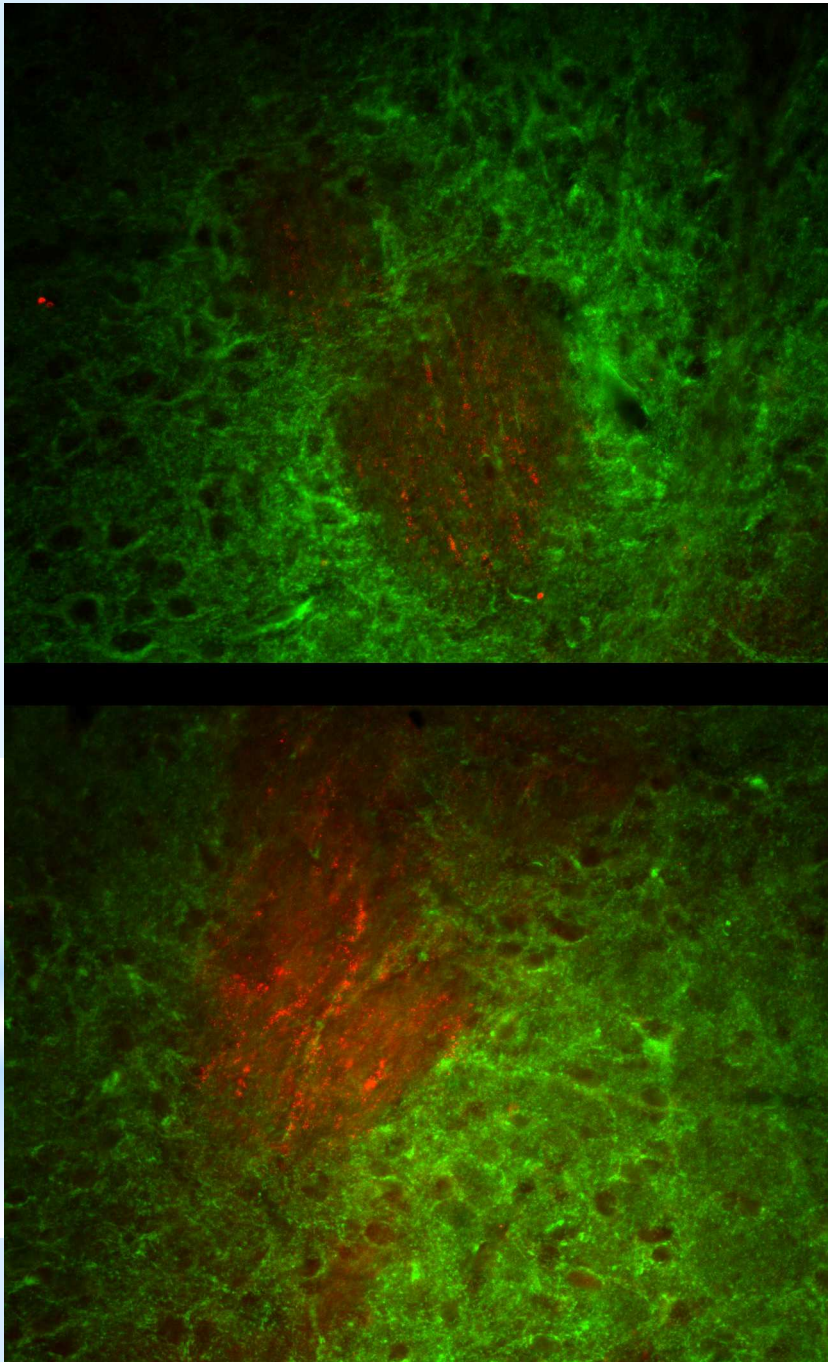
Sections coronales
corticales de souris à
P0



Section coronale de souris à P2 au
niveau de la décussation

Microscope confocal
x63





Double marquage anti-CytC
(mitochondries, vert) et
anti-RAD51 (rouge) au niveau
de la décussation:
pas de co-localisation.

* Conclusions et perspectives

- Identification de 6 variants chez 5 patients: mutations pathogènes ou polymorphismes rares ?
 - Arguments en faveur de la pathogénicité des faux-sens
 - Mais 2 variants retrouvés chez des témoins
- Cas familiaux versus sporadiques
 - Cas familiaux: mutations non-sens (2 pour *RAD51*, 4 pour *DCC*)
 - Cas sporadiques: variants faux-sens (5/6)
 - Pénétrance plus faible associée aux variants faux-sens ?
 - Facteurs de susceptibilité ?
- Existence de réarrangements ou d'un 3^e gène ?

*Conclusions et perspectives

- * *RAD51* est bien exprimé dans le SNC en développement
- * Expression différente de celle de *DCC*

Hypothèses sur la fonction de *RAD51*

1. Apoptose excessive lors de la corticogenèse précoce ?

- Localisation nucléaire à E12
- Souris *Xrcc2* *-/-* (Deans et al., 2000)

2. Fonction dans le guidage axonal ?

- Localisation cytoplasmique cortex + FCS à P0/P2
- Rôle de *RAD51* dans le remodelage de l'actine, impliquée dans la migration axonale (Orre et al., 2006)

* Conclusions et perspectives

Pour progresser dans la caractérisation du rôle de RAD51:

→ Modèles murins:

- RAD51 $-/-$ létal à un stade embryonnaire précoce (Lim et al., 1996)
- Souris RAD51 $+/-$: phénotype ? Morphologie ?
- Souris Cre-lox avec délétion de RAD51 dans le cortex





INSERM U975

Christel Depienne
Delphine Bouteiller
Alexis Brice
Agnès Rastetter
Caroline Nava
Antoine Guisier
Lydia Guennec

Fédération de Neurologie
Emmanuel Flamand-Roze



CNRS UMR 7102
Isabelle Dusart
Rosine Wehrlé

Banque d'ADN
Isabelle Lagroua
Sylvie Forlani
Christelle Dussert

Kailash Bhatia
Massimo Cincotta
Luc Defebvre
Stephan Klebe
Christine Klein
Julia Wickert



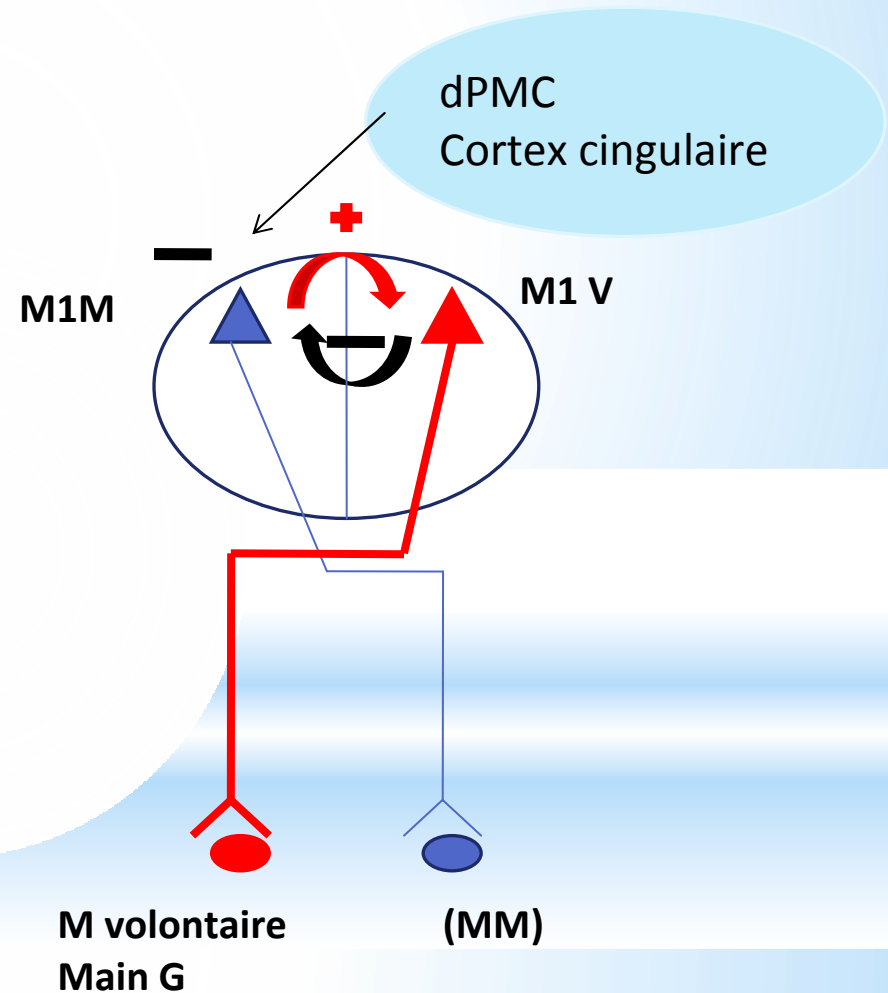
* Physiopathologie

Comment produit-on un mouvement unilatéral?

1. En amont de M1, rôle des cortex prémoteur et cingulaire pour limiter la sortie motrice au M1V

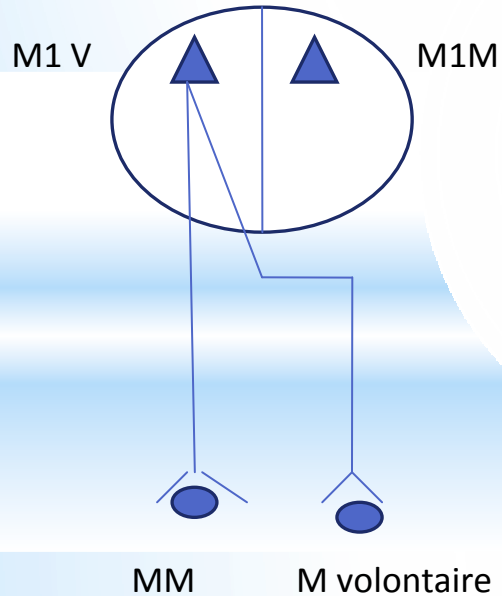
2. Inhibition active de la sortie motrice de M1M par l'IHI de M1V vers M1M (L'IHI de M1M vers M1V se transforme en une facilitation)

"Mouvement en miroir physiologique"
Fatigue, diminution de l'attention, âge, main non dominante, tâche complexe.
Dépendraient de l'activation de M1M

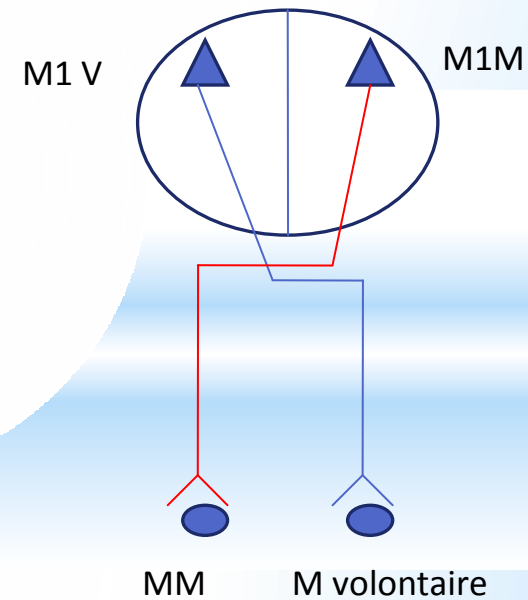


* Physiopathologie des MM

1) Persistance anormale du faisceau corticospinal ipsilatéral

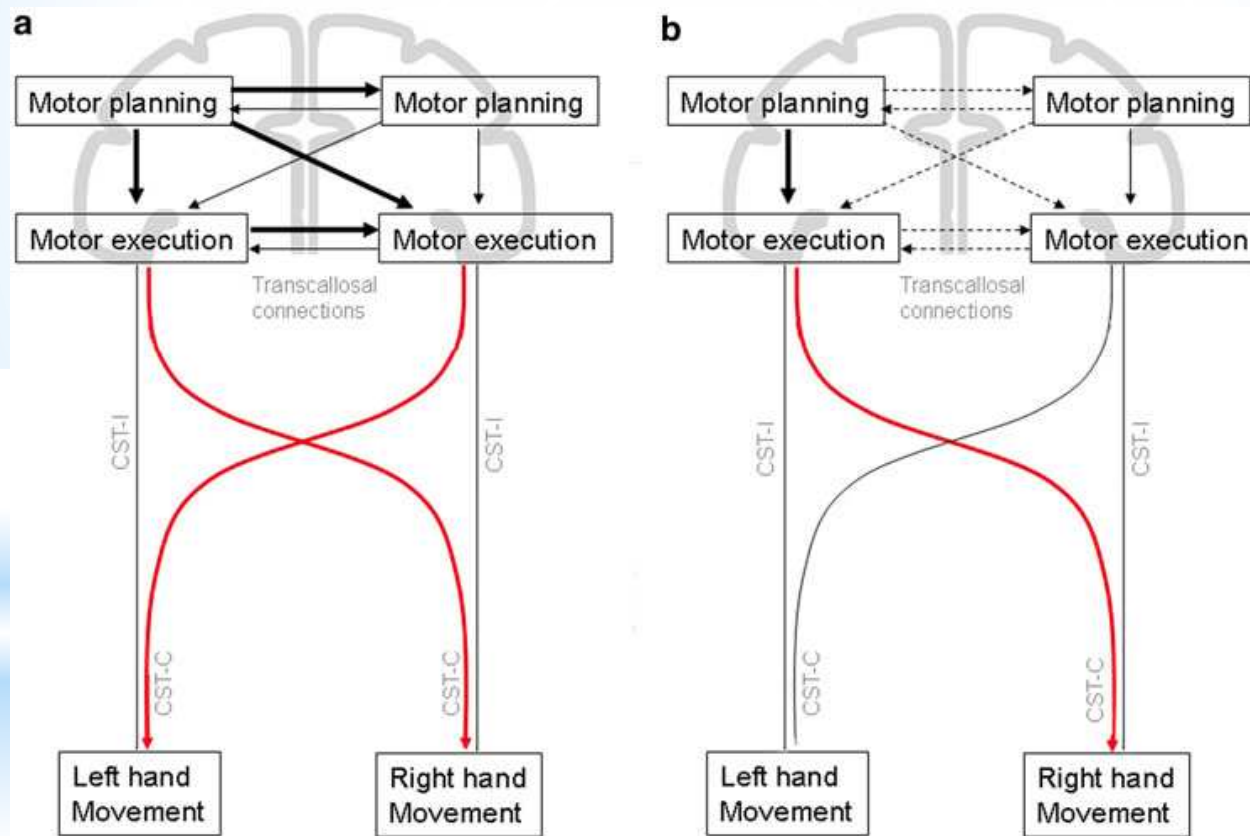


2) Défaut d'inhibition transcallosuse entre les 2 cortex moteurs



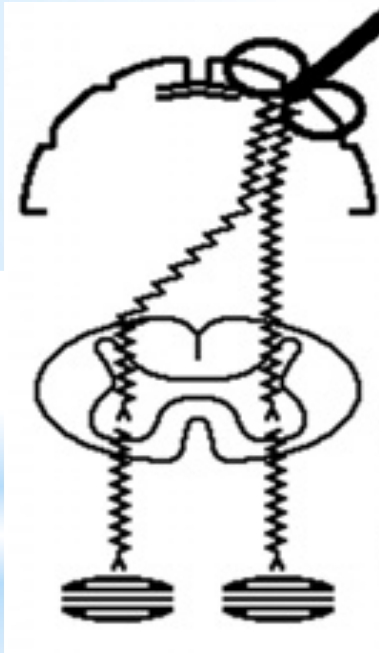
* Physiopathologie des MM

3) Trouble de la planification motrice (non publié)



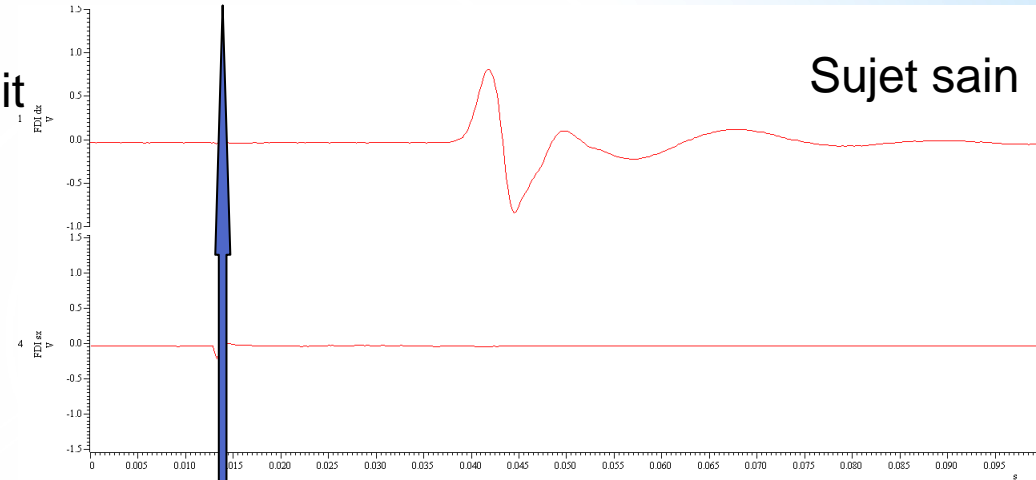
a: sujet normal; b: sujet avec MM congénitaux isolés

PEM ipsilatéraux



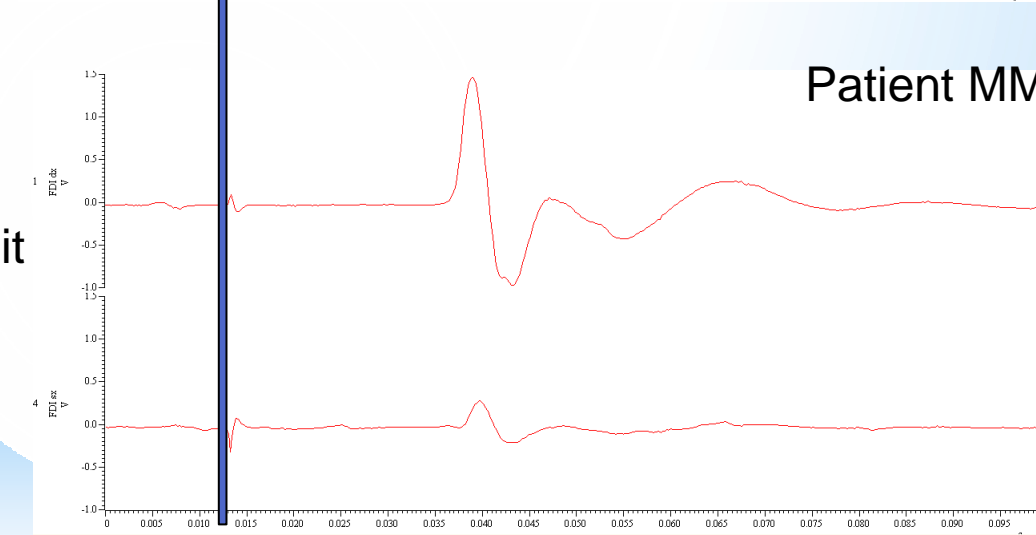
Stim TMS cortex gauche

FDI droit



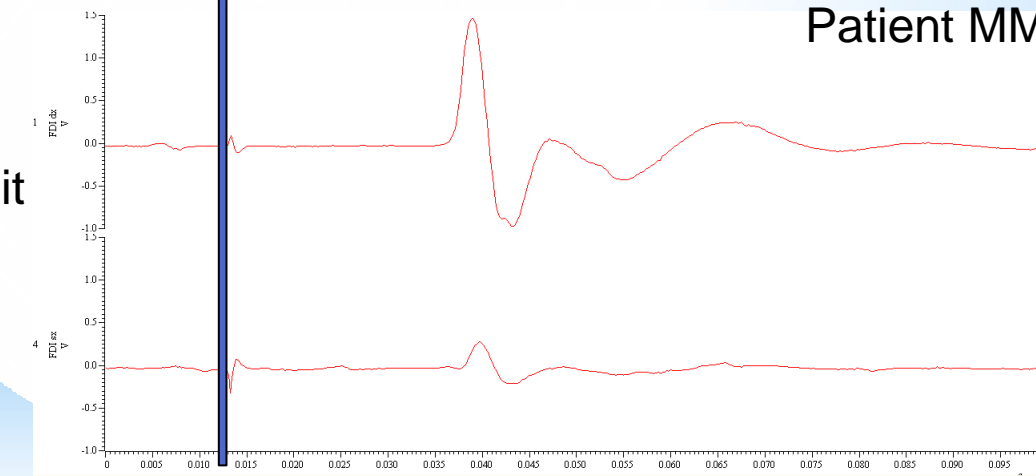
Sujet sain

FDI gauche



Patient MM

FDI droit

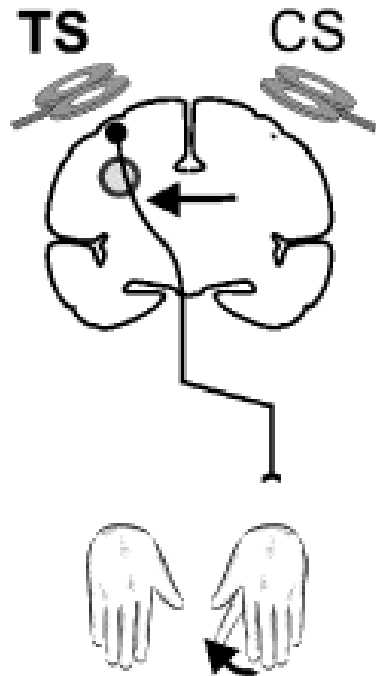


FDI gauche

Temps après la stimulation (ms)

TMS double choc mesure de l'inhibition interhémisphérique (IHI)

M1



IHI

ISI 10 ms SIHI
ISI 50 ms LIHI
TS 1.2 rMT
CS 1.2 rMT
Ferber et al 1992

SIHI : partie postérieure et isthme du corps calleux, organisation somatotopique
Wahl et al 2007, Zarei et al 2006

M1hand
M1face
PMd



Controlateral M1

Diminue avec le mvt

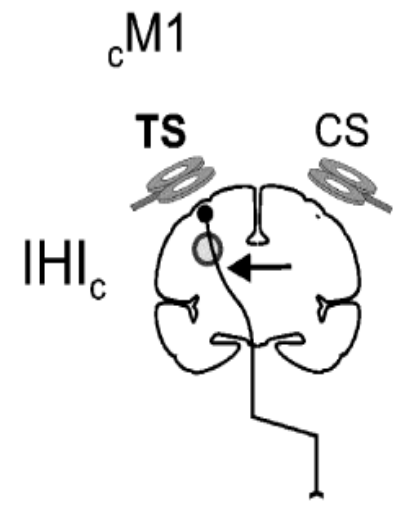
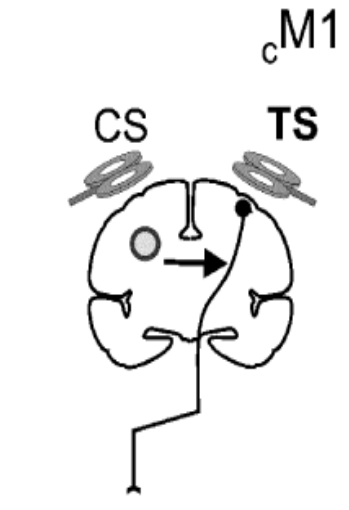
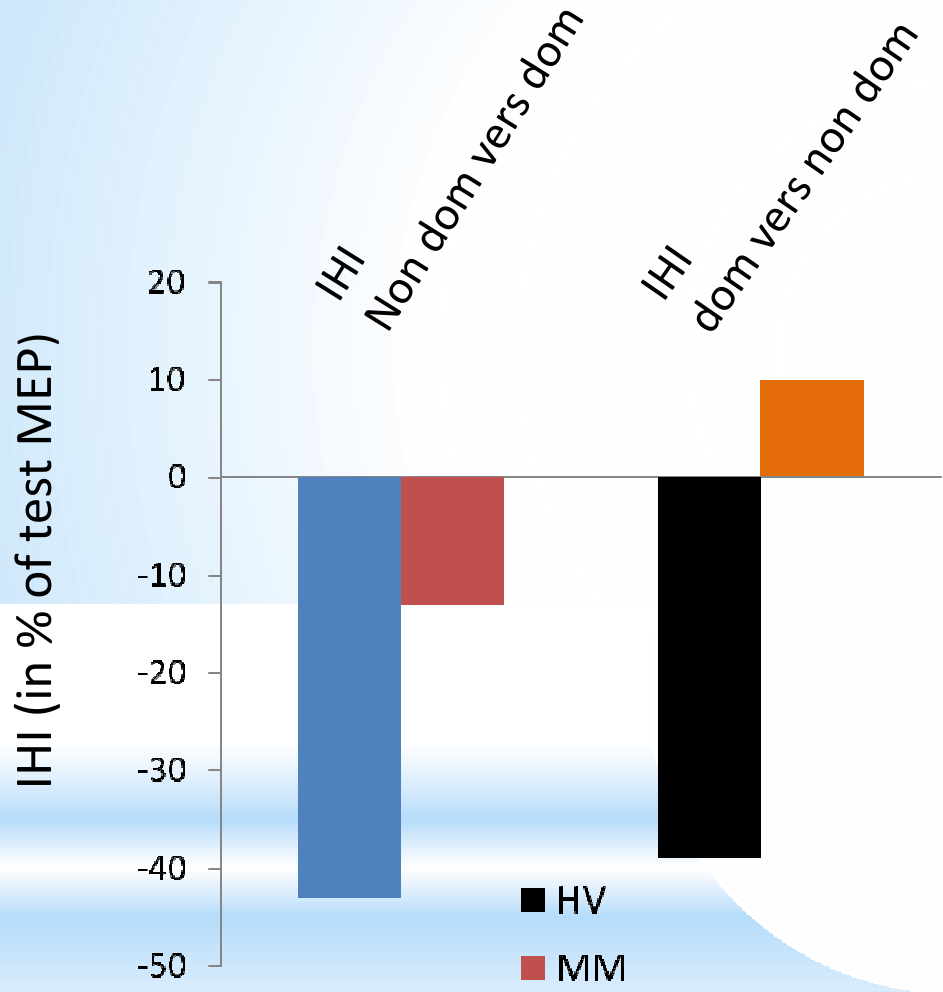
LIHI

M1 hand
M1 face
PMd
S1
DLPF



Contro
Lateral
M1

Peu modifiée par le mvt



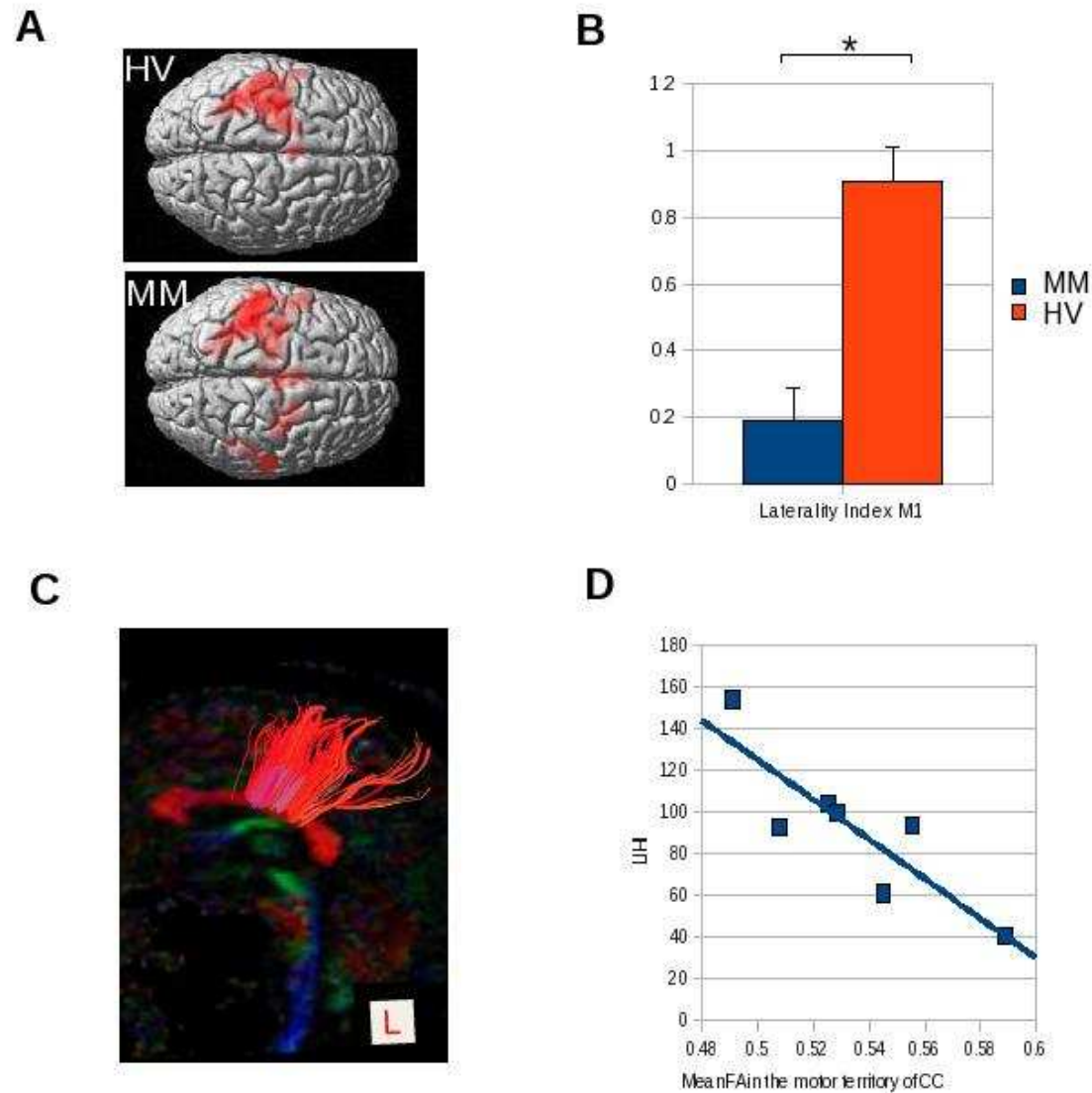
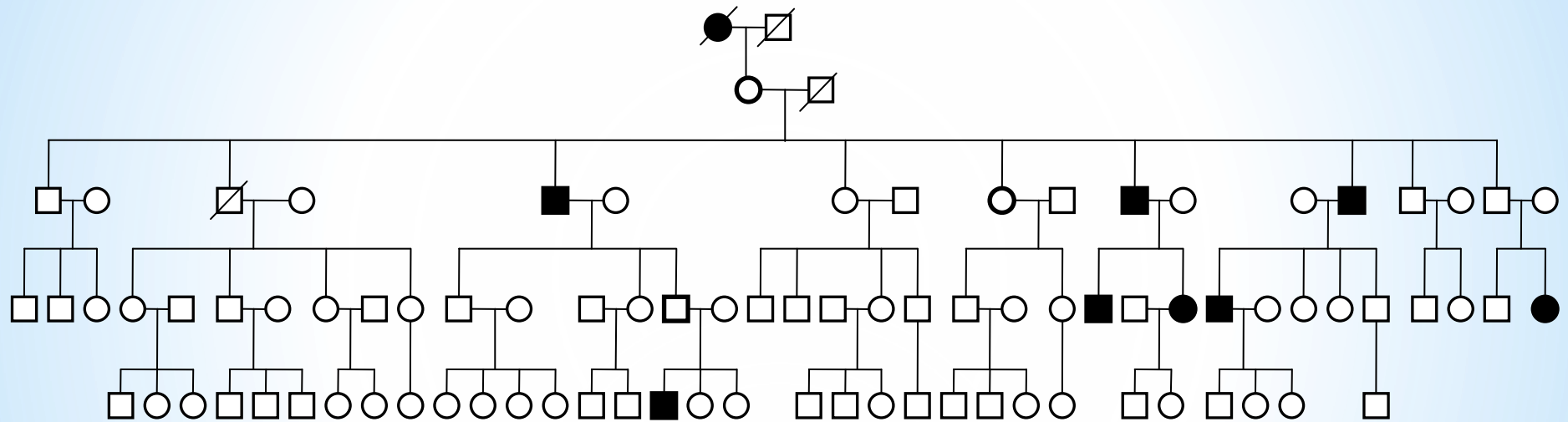
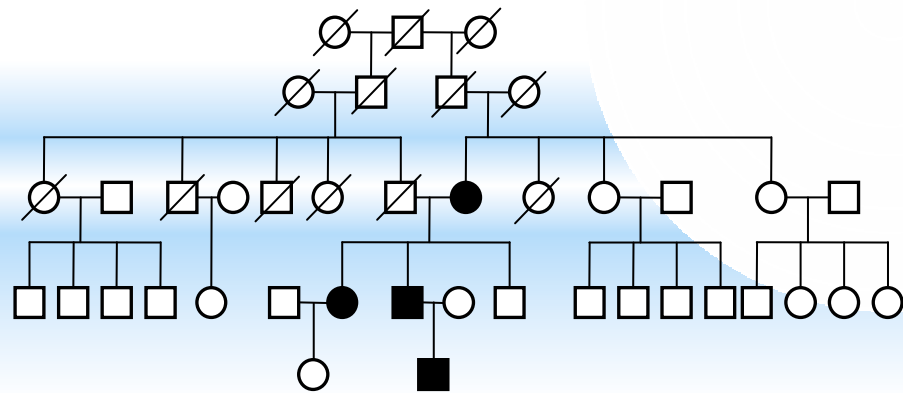


Figure 1. Functional, structural and electrophysiological abnormalities in the motor system of MM subjects. A) fMRI activity differences for the comparison of the motor task to a rest condition. B) Significant difference of Lateral index in M1 ($p < 0.001$). C) Fiber tracks (bright red) from the premotor and motor areas to the CC (dark red area) superimposed on a FA-color map in one MM subject (L=left). D) Correlation between mean FA weighted with the probability of connection and LIHI values in MM subjects.

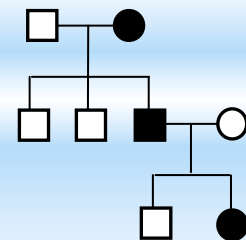
Familles avec mouvements miroir



Famille française

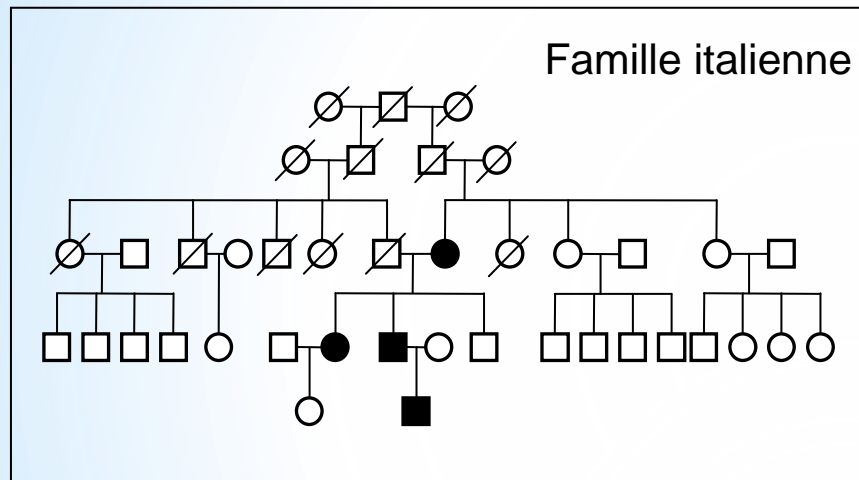


Famille italienne

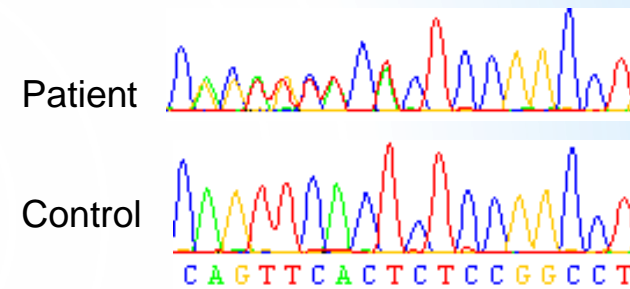


Famille allemande

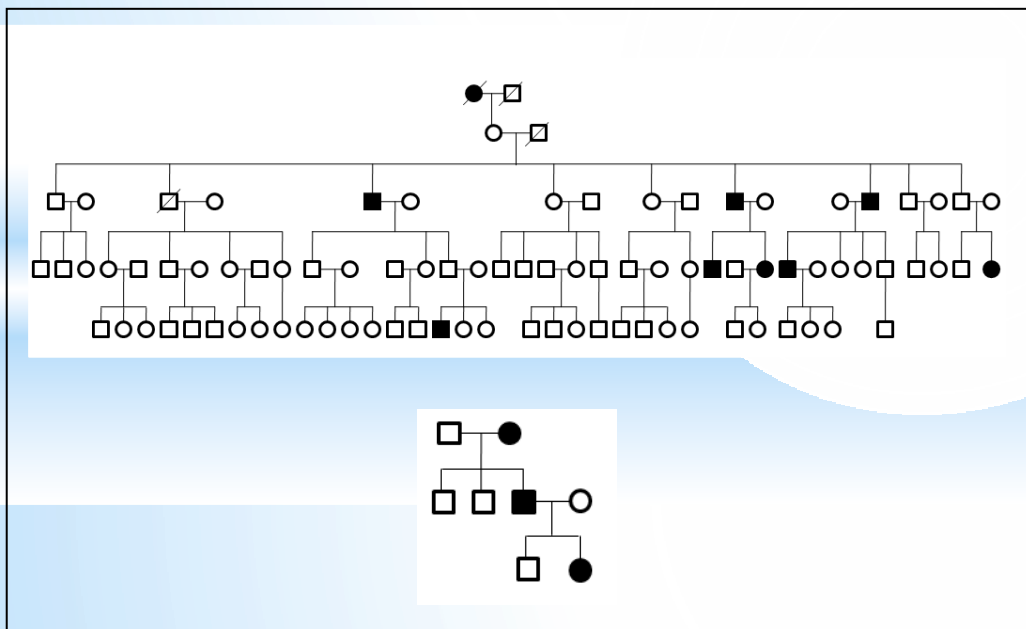
Analyse de DCC dans les 3 familles



➔ Mutation dans l'exon 26 de *DCC*

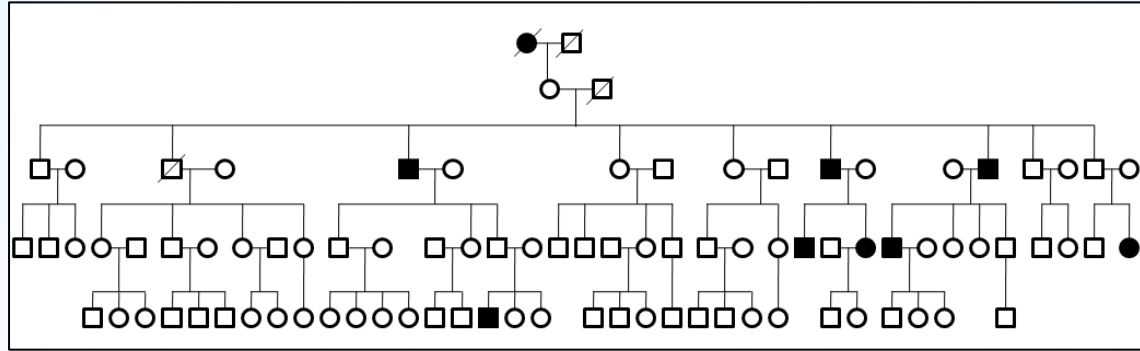


c.3835_3836del/p.Leu1279ProfsX24



➔ Absence de mutation ponctuelle

Depienne et al., neurology, 2011



Genome-wide linkage



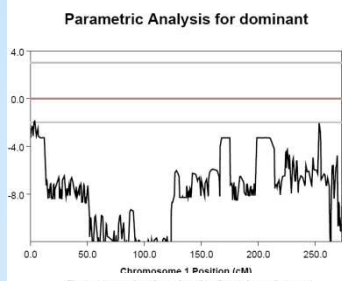
Locus



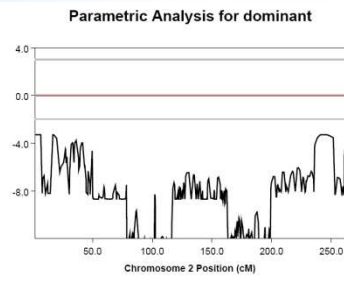
Exome sequencing



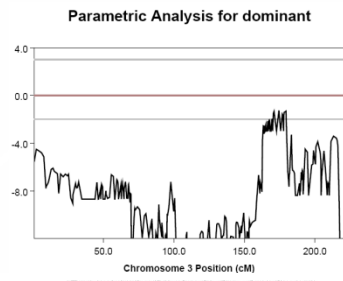
Gene



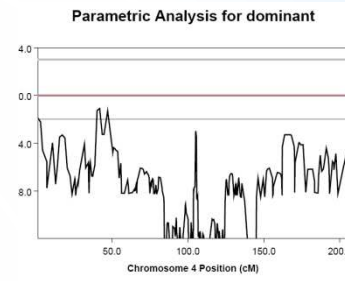
Parametric Analysis for dominant



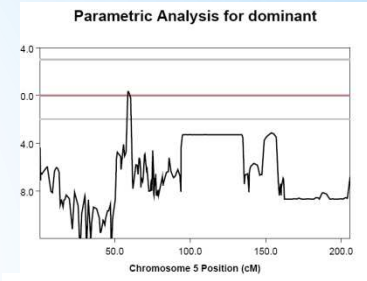
Parametric Analysis for dominant



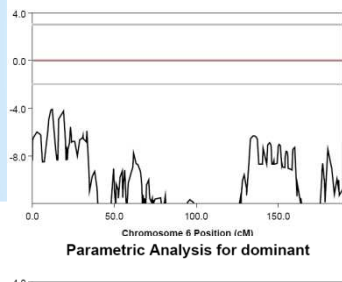
Parametric Analysis for dominant



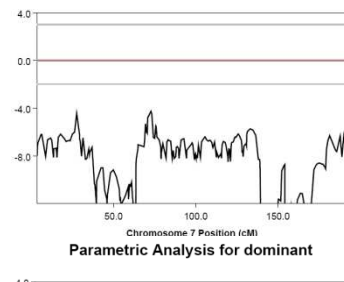
Parametric Analysis for dominant



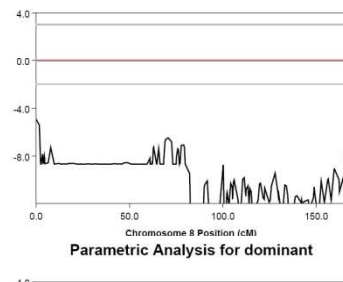
Parametric Analysis for dominant



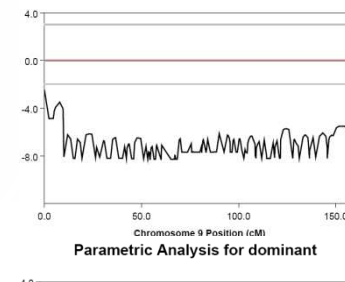
Parametric Analysis for dominant



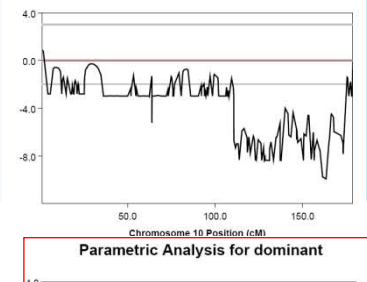
Parametric Analysis for dominant



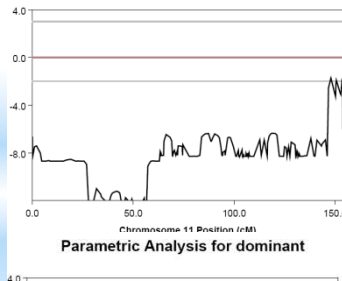
Parametric Analysis for dominant



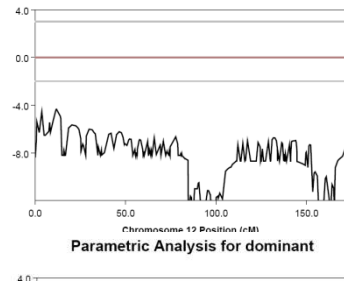
Parametric Analysis for dominant



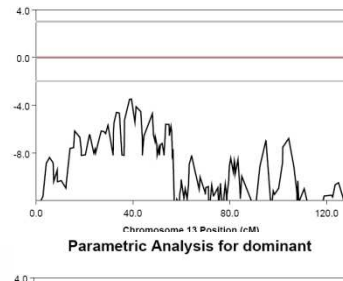
Parametric Analysis for dominant



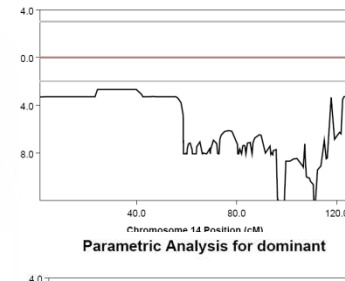
Parametric Analysis for dominant



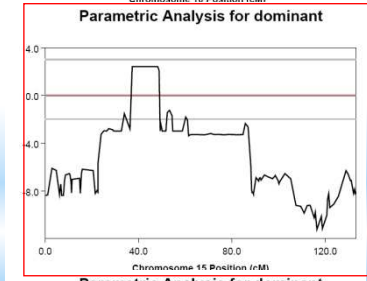
Parametric Analysis for dominant



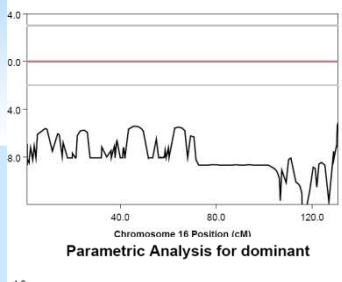
Parametric Analysis for dominant



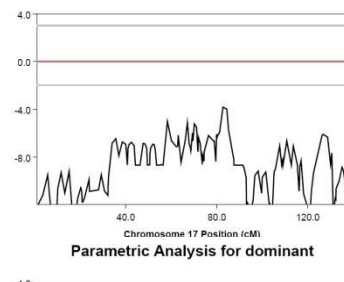
Parametric Analysis for dominant



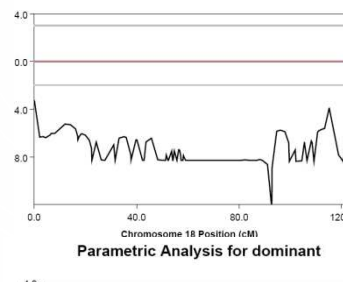
Parametric Analysis for dominant



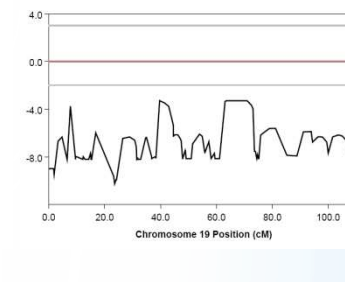
Parametric Analysis for dominant



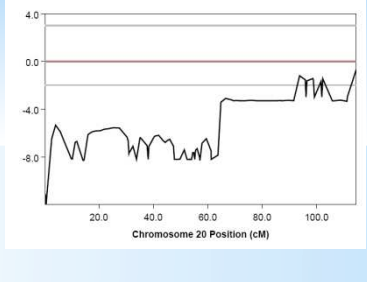
Parametric Analysis for dominant



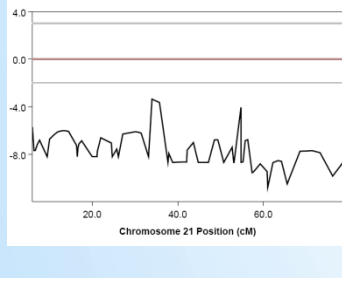
Parametric Analysis for dominant



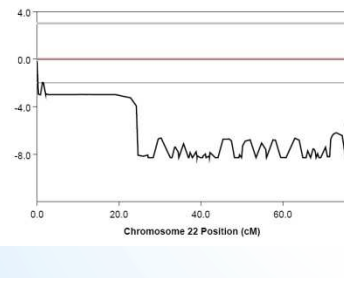
Parametric Analysis for dominant



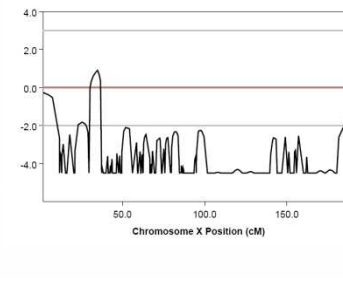
Parametric Analysis for dominant



Parametric Analysis for dominant



Parametric Analysis for dominant

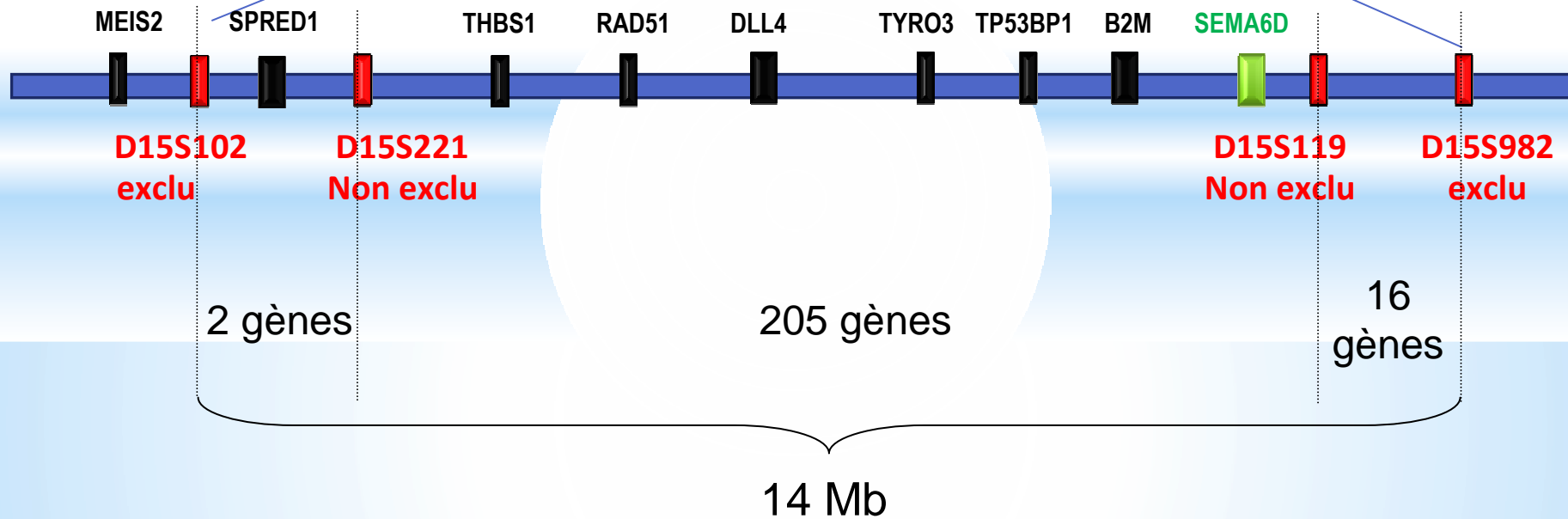
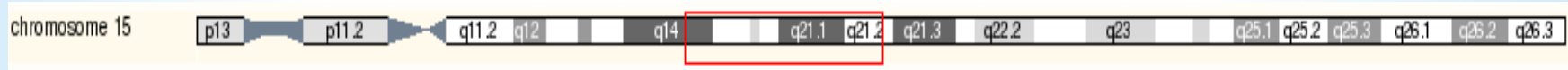


Parametric Analysis for dominant



Un seul locus positif
sur le chromosome 15

Région candidate du chromosome 15

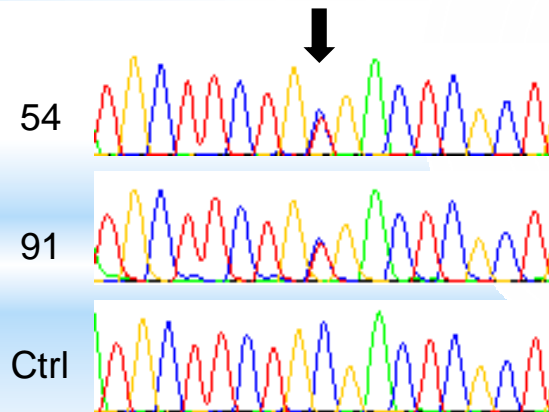


➔ Exome sequencing

Identification de mutations dans le gène *RAD51* par séquençage Sanger

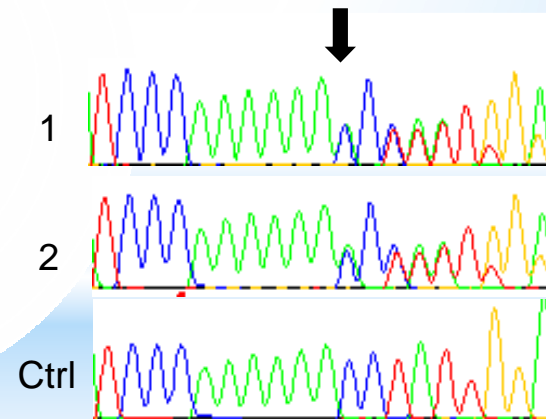
Famille française

Exon 8
c.760C>T/ p.Arg254X



Famille allemande

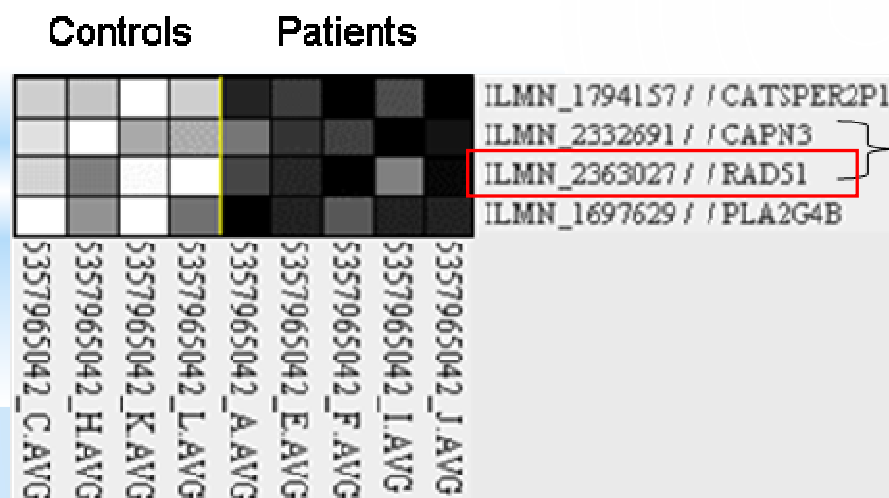
Exon 9
c.855dup/ p.Pro286ThrfsX37



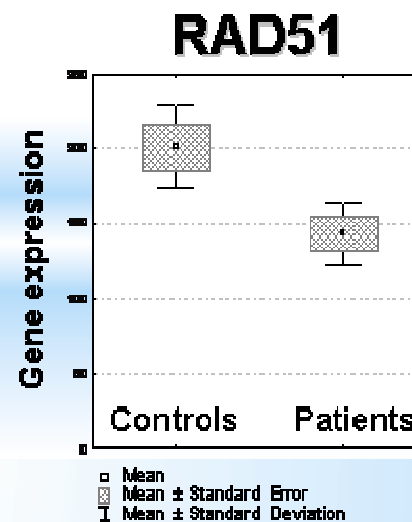
Recherche du gène par transcriptome

Unique id	Gene symbol	Fold-change Controls / Patients	Parametric p-value	Controls Gene expression	Patients Gene expression
ILMN_1794157	CATSPER2P1	1.51	0.002	172.77	114.67
ILMN_1697629	PLA2G4B	1.52	0.005	541.34	356.32
ILMN_2363027	RAD51	1.42	0.009	200.72	141.79
ILMN_2372379	MGA	1.24	0.009	78.27	63.15
ILMN_2401906	CDAN1	1.31	0.014	11358.92	8684.88
ILMN_1710329	MYEF2	1.96	0.030	23.11	11.8

well expressed in brain
(4 targets)



well expressed in brain
(2 targets)



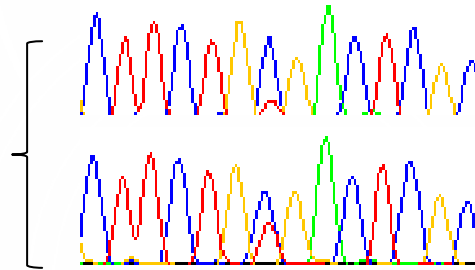
Analyse des mRNA de lymphoblastes

famille française

p.Arg254X
(Exon 8)



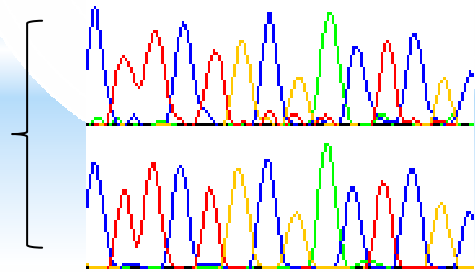
Patient



- emetin

+ emetin

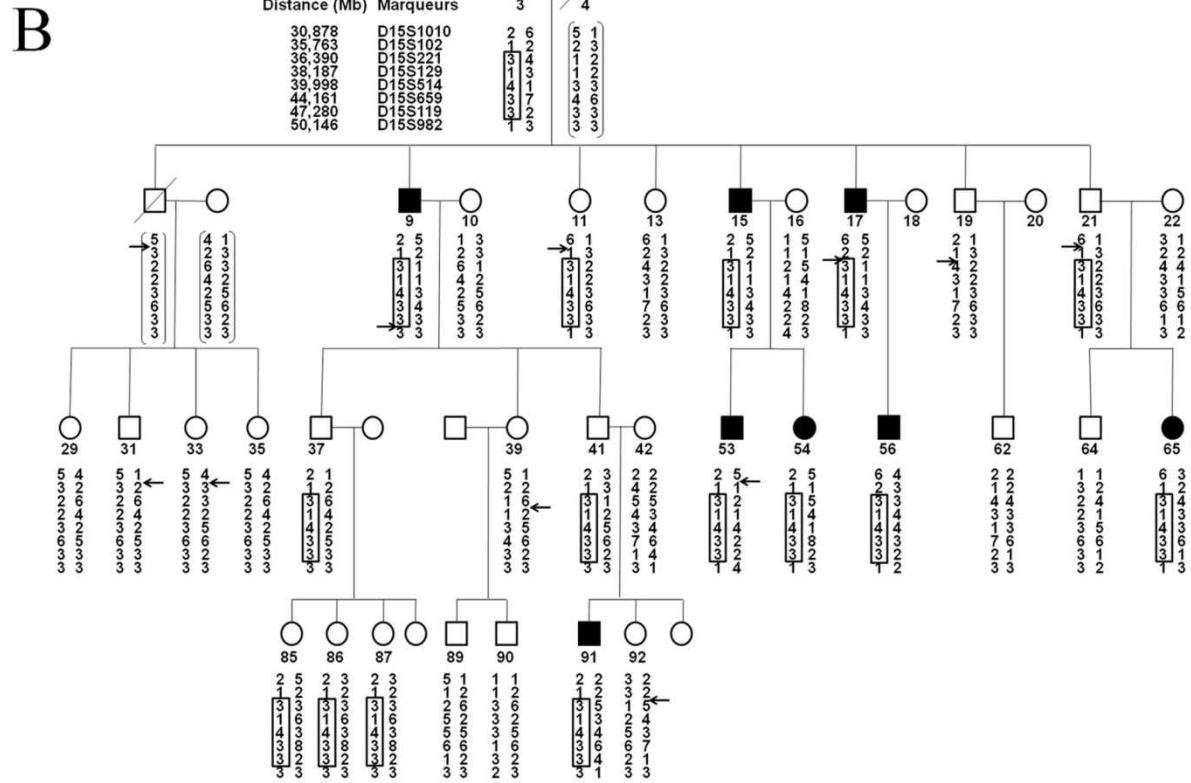
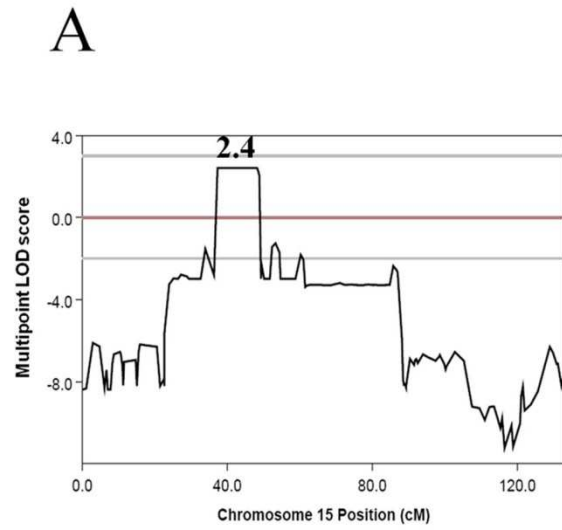
**Contrôle
Non muté**



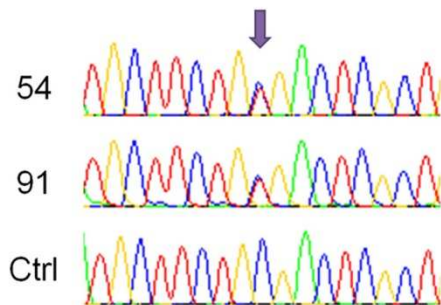
- emetin

+ emetin

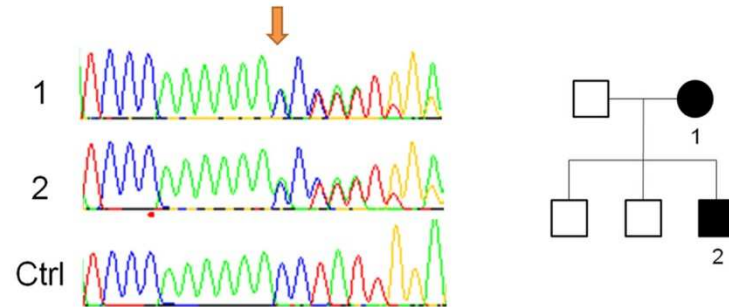
Figure 1



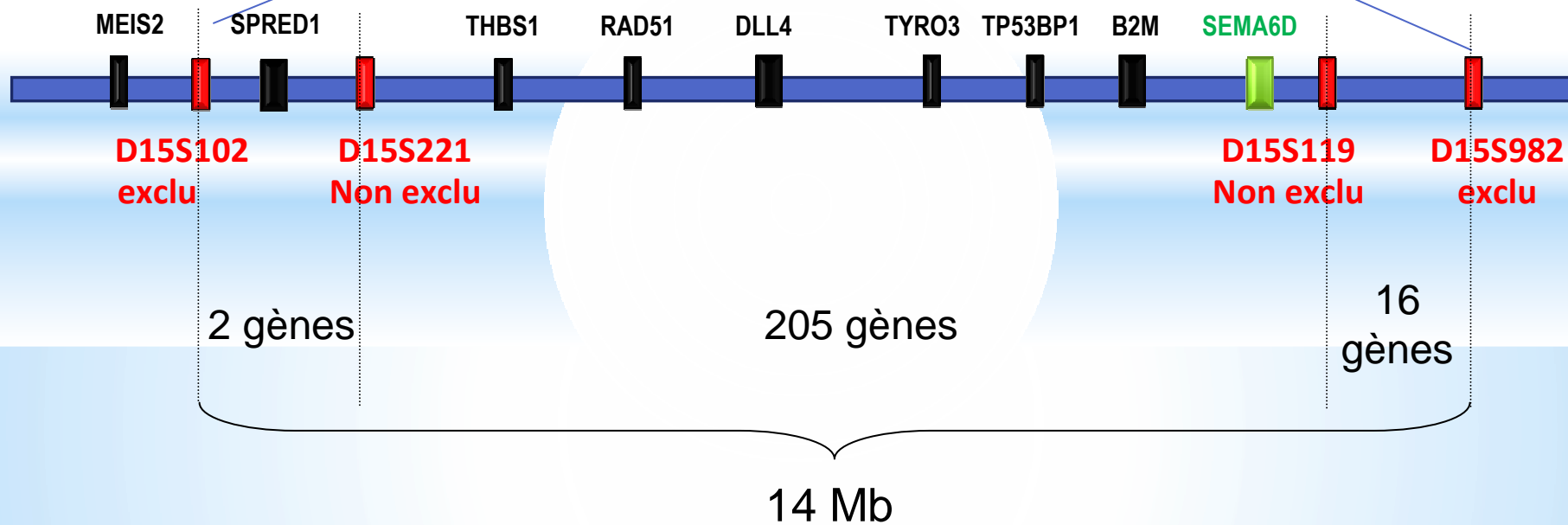
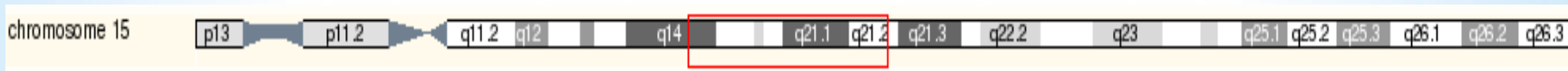
C c.760C>T / p.Arg254X (Exon 8)



D c.855dup / p.Pro286ThrfsX37 (Exon 9)



Région candidate du chromosome 15



➔ Exome sequencing

*DCC

- * C.527A>G (pAsn176Ser): domaine Ig-like
- * c.1409G>A (pGly470Asp): domaine fibronectin III n° 1
- * c.2000 G>A (pArg667His): domaine fibronectin III n° 3
- * c.2407 G>A (pGly803Asp): domaine fibronectin III n° 4 (liaison netrin)
- * 726-939: domaines fibronectin III n° 4 et 5: liaison netrin

*RAD51

- * c.140A>G (pHis47Arg): domaine de réparation de l'ADN (juste avant le domaine HhH 48-77)

Conditional mutagenesis using the Cre/loxP system

