

Thèse : Génome non codant et maladies cardiaques génétiques : recherche de variants et analyses fonctionnelles

Réalisation de la thèse :

Ce travail de thèse sera réalisée dans l'équipe Cardiomics, dont les travaux sont centrés sur l'analyse multi-omique dans les maladies cardiaques génétiques, au sein de l'unité UR4666 HEMATIM. Celle-ci est situé dans le Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS).

Il se fera également en lien étroit avec

- le laboratoire de Génétique Constitutionnelle du CHU Amiens-Picardie (CHUAP) et des équipes médicales de génétique et de cardiologie du CHU.
- la FHU Génomique G4 regroupant des équipes de recherche au sein de l'inter-région Nord-Ouest dans l'objectif d'explorer le génome non codant dans les maladies génétiques
- la filière maladies Rares Cardiogen à laquelle les équipes d'Amiens appartiennent.

Contexte médical et scientifique :

Les maladies cardiaques héréditaires regroupent trois grandes entités qui ont des modes de révélation et des complications différentes : les troubles du rythme héréditaires, les cardiomyopathies et les malformations cardiaques complexes. Ces trois groupes de pathologies partagent des caractéristiques génétique communes : une transmission le plus souvent autosomique dominante, une pénétrance incomplète et une expressivité variable y compris en intrafamilial, et une hétérogénéité génétique et allélique.

Depuis 30 ans, en raison des progrès des technologies de biologie moléculaire, de nombreux travaux ont été menés permettant de progresser dans l'identification des bases moléculaires de ces pathologies. Ainsi, des variations dans les régions codantes des gènes impliqués dans le développement et/ou le fonctionnement du cœur ont été identifiées comme causales du développement de ces pathologies. Aujourd'hui, des variations sont identifiées dans :

- 20 à 40% des cas de cardiomyopathies en particulier dans des gènes codant pour des protéines du sarcomère ou de facteurs assurant transcription et régulation
- 40-50 % des cas dans les troubles du rythme héréditaire, il s'agit essentiellement de gènes codant des canaux ioniques
- 20-30% des cas dans les malformations cardiaques, où l'hétérogénéité génétique est plus importante.

Les progrès techniques récents, notamment le séquençage d'exome, augmentent encore un peu ce rendement. Des études sont en cours dans notre équipe, avec des travaux de séquençage d'exome dans les cardiomyopathies de révélation pédiatriques (projet CANOPE) et dans les cardiomyopathies dilatées avec troubles conductifs (projet GEN-RAR).

Cependant, ces projets ne permettront pas d'identifier de nouveaux gènes responsables dans les 50% de patients sans diagnostic à ce jour.

Une nouvelle approche pour progresser dans ces pathologies est de se tourner vers l'étude du génome non codant. Certaines études récentes ont montré que des variants non codants sont impliqués dans ces pathologies par plusieurs mécanismes : des variants introniques profonds impactant l'épissage (Janin et al, Hum Mutat. 2020, PMID: 31730716), des variants des régions promotrices ou régulatrices

impactant quantitativement l'ARNm (Khatami et al, Curr Med Sci. 2022, PMID: 34652630), ou des variants de la région 3'UTR impactant la régulation post transcriptionnelle (Wimbo et al, J Am Heart Assoc. 2022, PMID: 36102229). Ainsi se renforce l'idée que des variants localisés hors des régions codantes pourraient être i) être responsables de la pathologie et ii) expliquer la variabilité phénotypique inter et intrafamiliale.

Objectif :

L'objectif de cette thèse sera d'explorer le génome non codant, en se centrant sur les régions introniques et régulatrices des gènes connus en pathologie, d'identifier des variants d'intérêt et d'explorer leurs conséquences par des techniques in vitro. Et, au final, de permettre d'optimiser la prise en charge des patients et de leurs familles.

Matériel et méthodes :

1- Cohorte de patients :

Les échantillons de patients sont disponibles dans le Laboratoire de Génétique Constitutionnelle du CHU Amiens-Picardie (CHUAP). Le laboratoire dispose de plus de 3000 cas index phénotypés ayant donné leur accord pour la recherche médicale dans leurs pathologies.

Le phénotype précis sera réalisé en collaboration avec les cardiologues de l'équipe Cardiomics.

2- Analyses génomiques :

Les analyses génomiques seront réalisées en étroite collaboration avec le Laboratoire de Génétique constitutionnelle du CHU Amiens-Picardie

Elles reposeront sur l'utilisation de deux technologies

- La cartographie optique du génome (COG) utilisant la technologie Bionano Genomics® afin d'identifier des variations de structure des chromosomes (délétion, duplication, inversions, translocations...) qui pourra modifier l'expression des gènes d'intérêt. Le laboratoire dispose de tout le matériel nécessaire pour ces analyses, ainsi que d'un scanner Saphyr® pour la lecture des données. L'analyse informatique se fera à l'aide de la solution Bionano Access et des protocoles recommandés par le fournisseur. Au besoin, des confirmations pourront être réalisées par CGH-array (technologies oligonucléotide Agilent Technologies®), caryotype et/ou FISH.
- Le séquençage de génome entier (WGS) de type long-read avec la technologie ONT (Oxford Nanopore Technologies®) afin de séquencer les régions non codantes des gènes impliqués dans les maladies cardiaques. Le laboratoire dispose des automates GridION et P2 solo et de financement pour l'achat des réactifs adaptés. L'analyse informatique des données se fera à l'aide de la solution Epi2Me et d'un pipeline à façon réalisé en lien avec la plateforme informatique MatriCS de l'UPJV. Au besoin, des confirmations pourront être réalisées en séquençage haut débit short-read Illumina ou en séquençage Sanger.

3- Analyses fonctionnelles :

Les effets des variations d'intérêt identifiées en COG ou en WGS long-read seront explorés in vitro afin de confirmer leur impact sur l'expression génique.

Selon les situations et la localisation des variants identifiées, pourront être réalisées :

- des analyses d'ARN à partir de nouveaux prélèvements de patients par des approches ciblées de type RT-QPCR et/ou séquençage ou par des approches larges de type RNA-Seq sur capture (technologie de capture XTBS2 à façon d'Agilent Technologies®, séquençage sur automates Illumina ou nanopore)
- des analyses d'ARN in vitro par technologie minigène en clonant les fragments d'intérêt dans un vecteur d'expression pTB2 puis en transfectant ces vecteurs dans une lignée cellulaire HEK293 afin d'en étudier l'épissage
- des analyses des UTR, des séquences promotrices et régulatrices par technologie gène rapporteur en clonant ces régions dans un vecteur d'expression type pGL3 ou pGL4 puis en transfectant ces vecteurs dans des cellules HEK293 ou dans des cardiomyocytes selon le contexte.

L'équipe du laboratoire de Cancer biology and Molecular Immunology de l'université libanaise est experte dans le domaine des microARNs et de leur rôle dans la régulation des gènes. Les microARNs (miR) sont des ARN simple brin non codants d'environ 22 nucléotides que l'on trouve chez les animaux, les plantes et les algues. Ces ARN modulent l'expression des gènes en bloquant la traduction et/ou en déstabilisant leurs ARNm cibles. Une expression aberrante des miRs a été décrite dans plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète ainsi que les maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont montré l'implication de certains miRs dans les maladies cardiaques telles que les troubles du rythme et les hypertrophies cardiaques (Cai et al, Curr Med Chem. 2010, PMID: 20015039, Catalucci et al, Circulation: Cardiovascular Genetics 2009, PMID : 20031613).

Un criblage du profil d'expression des microARN sera réalisé chez les sujets atteints de cardiopathies en comparaison avec des sujets sains du même âge à l'aide du Taqman Low Density Array (TLDA) qui est une carte micro fluide qui nous permet de cribler le niveau d'expression de 384 microARNs. Après avoir identifié les microARNs différemment exprimés, nous procéderons à la confirmation individuelle de ces miR exprimés différemment par qRT-PCR. Étant donné qu'un miR downrégulé est supposé upréguler l'expression de son gène cible, nous allons cribler les séquences 3'UTR pour les sites de liaison potentiels miRs régulés à la baisse. Ainsi, nous allons cloner la région 3' UTR des gènes du panel cardio dans un vecteur psiCHECK-luc et effectuer la transfection et la co-transfection avec ces miRs dans différentes lignées cellulaires (Hela, 293T, Jurkat, Raji, U937). Un scrambled miR sera utilisé comme contrôle négatif. Ayant obtenu une diminution de l'activité de la luciférase suite à des tests de transfection ou de co-transfection, nous procéderons à la mutation des sites de liaison potentiels de miR pour déterminer le miR responsable de la régulation négative de l'expression des gènes.

Résultats attendus :

Ce travail apportera un regard sur l'importance des régions non codantes des gènes déjà associés aux maladies cardiaques héréditaires.

Il mettra en lumière :

- de nouveaux variants introniques responsables de pathologies cardiaques, et leur proportion, ce qui permettra d'envisager de modifier les tests diagnostiques génétiques actuellement réalisés pour ces patients,
- des variants pouvant moduler l'expression du phénotype et expliquant la variabilité du phénotype de ces pathologies, ce qui permettra de s'approcher un peu plus d'une médecine personnalisée, évitant les complications liées aux thérapeutiques préventives actuellement recommandées.

Au final, l'objectif du travail sur le génome non codant est d'améliorer les conditions de diagnostic génétique en soin courant, d'identifier de nouveaux éléments pronostiques en cas de pathologies et

in fine de contribuer aux décisions thérapeutiques (priorisation de la transplantation cardiaque, cibles thérapeutiques médicamenteuses précises...)

Bibliographie :

Whole MYBPC3 NGS sequencing as a molecular strategy to improve the efficiency of molecular diagnosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Janin A, Chanavat V, Rollat-Farnier PA, Bardel C, Nguyen K, Chevalier P, Eicher JC, Faivre L, Piard J, Albert E, Nony S, Millat G. Hum Mutat. 2020 Feb;41(2):465-475. doi: 10.1002/humu.23944PMID:

Novel Point Mutations in 3'-Untranslated Region of GATA4 Gene Are Associated with Sporadic Non-syndromic Atrial and Ventricular Septal Defects. Mehri Khatami, Sajedeh Ghorbani, Mojgan Rezaii Adriani, Sahar Bahaloo, Mehri Azami Naeini, Mohammad Mehdi Heidari, Mehdi Hadadzadeh. Curr Med Sci. 2022 Feb;42(1):129-143. doi: 10.1007/s11596-021-2428-9.

Multomics Analysis of Transcriptome, Epigenome, and Genome Uncovers Putative Mechanisms for Dilated Cardiomyopathy. Liu L, Huang J, Liu Y, Pan X, Li Z, Zhou L, et al.. BioMed Res Int. 2021;2021:6653802.

To Modify or Not to Modify: Allele-Specific Effects of 3'UTR-KCNQ1 Single Nucleotide Polymorphisms on Clinical Phenotype in a Long QT 1 Founder Population Segregating a Dominant-Negative Mutation. Winbo A, Diamant UB, Persson J, Jensen SM, Rydberg A. J Am Heart Assoc. 2022 Sep 20;11(18):e025981. doi: 10.1161/JAHA.122.025981.

MicroRNAs in Cardiovascular Biology and Heart Disease. Daniele Catalucci, Paolo Gallo and Gianluigi Condorelli. Circulation: Cardiovascular Genetics, 2009. Volume 2, Number 4. doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.857425

The Roles of MicroRNAs in Heart Diseases: A Novel Important Regulator. Cai B. Z., Pan Z. W. and Lu Y. J. Current Medicinal Chemistry; Volume 17, Issue 5, Year 2010. DOI: 10.2174/092986710790226129.