

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 19 décembre 2012

Par M. Alexandre, Jean-Marie FABRE

Né le 5 avril 1978 à La Teste de Buch (Gironde, FRANCE)

**Bases moléculaires des diarrhées syndromiques
(syndrome tricho-hépto-entérique)**

Pour obtenir le grade de DOCTEUR d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : Pathologie humaine/génétique humaine
LABORATOIRE : UMR_S 910

Membres du Jury de la Thèse :

M. le Dr SERAPHIN Bertrand : Rapporteur
M. le Pr VIDAUD Michel : Rapporteur
M. le Pr MEGE Jean-Louis : Examineur
M. le Pr ROYET Julien : Examineur
M. le Pr GOULET Olivier : Examineur
Mme le Pr BADENS Catherine : Directrice de thèse

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas été possible sans la confiance des patients et de leur famille. J'espère que nos résultats, en mettant un nom définitif sur la maladie, contribueront à les aider

Je remercie le Pr. Vidaud et le Dr. Seraphin d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et de siéger au jury ainsi que le Pr. Mege, le Pr. Goulet, le Pr. Royet d'avoir accepté d'être membre du jury.

Ce travail est l'aboutissement (mais non le point final, j'espère) d'une démarche qui a commencé en 2006, lorsque, suite à des discussions avec Bertrand Roquelaure et Nicolas André, j'ai décidé de faire mon travail de master 2 sur les bases moléculaires des diarrhées syndromiques. De cette chétive idée a finalement germé ce travail. Je les remercie pour leur aide constante et leur soutien indéfectible.

Ce travail est aussi celui de mon directeur de thèse Catherine Badens. Je suis très heureux qu'elle m'ait encadré pour mon travail de Master 2 et de thèse. Sa gentillesse et sa disponibilité ont fait que ce tutorat a été un plaisir. De plus son soutien constant, sa capacité d'écoute de mes élucubrations (en gardant le bon grain et rejetant l'ivraie) et son exigence permanente de qualité m'ont permis d'aller toujours plus loin.

Je remercie le Pr. Levy d'avoir cru à ce projet et de m'avoir accepté dans son équipe.

Le travail de thèse de médecine de Christine Martinez qui a fait un état des lieux clinique des patients et de la maladie, a été d'une aide décisive. De même, son enthousiasme nous a permis de concrétiser ce projet en nous aidant à constituer la cohorte initiale. Je remercie aussi tous les cliniciens qui ont immédiatement accepté de collaborer avec nous et qui ont toujours été disponibles : le Dr Anne Breton de Toulouse, le Dr Noel Peretti et le Pr. Lachaux de Lyon, les Drs Ariane Perry, Evelyne Marinier et le Pr. Hugo de l'hôpital Robert Debré, les Drs Virginie Colomb, Julie Salomon et le Pr. Goulet de l'hôpital Necker, les Drs Beatrice Dubern, Julie Lemale et Aude Venaille de l'hôpital Trousseau, les Dr. Odul Egritas et le Dr. Ersin Sayar de Turquie, le Dr. Carter Melissa du Canada, le Dr. Hilary Smith des Etats-Unis.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de biologie moléculaire de la Timone et de l'unité l'UMRS 910 pour leur aide et leurs conseils et plus particulièrement Caroline Lacoste, Charlène Chaix, Sébastien Courrier, Nathalie Da Silva, Daniel Depetris, Nathalie Roelckel et Françoise Merono.

Je remercie Nathalie Bonello, Perrine Malzac, Annachiara DeSandre, Martin Krahn, Christophe Beroud et Raphaëlle Bernard pour les nombreuses discussions partagées au cours de ces dernières années sur des sujets divers et variés. Ces discussions, parfois autour d'un café, étaient toujours très enrichissantes.

Je remercie le Pr. Royet et le Dr. Charroux. En créant au sein de l'IBDML, un modèle de drosophile mutée en *TTC37* ils nous ont mis sur la voie du 2eme gène des THE et ont ouvert la porte à des projets communs.

Je remercie l'équipe de l'unité d'anatomopathologie du Pr. Figarella pour leur aide dans les analyses en immuno-histochimie., et en particulier Anne Laure Chesnais.

Je remercie Partnership et notamment le Dr. Baulande pour son aide dans l'interprétation des données d'analyses de liaison.

Je remercie l'unité de cytogénétique du Pr. Moncla et particulièrement Julie Martinez, Anne Moncla, Chantal Missirian et Cornel Popovici pour leur aide dans la recherche de micro délétions et les analyses en puce.

Au cours de ces 6 années, j'ai souvent discuté des diarrhées syndromiques avec des collègues issus de différentes disciplines afin de mieux comprendre la physiopathologie voire d'étayer des pistes ou des collaborations. Je remercie le Pr. Vivier, le Dr. Farnarier, le Dr. Vely, Le Dr Barlogis, le Pr.Morange, le Dr Corrine Frere, le Pr. Rolain et le Pr. Brochier-Armanet.

Je remercie l'équipe du 15eme et du 16eme du service de pédiatrie pluridisciplinaire, où j'ai fait, sous la direction du Pr. Sarles, mes premières armes en tant qu'interne et mon clinicat. Je remercie particulièrement l'équipe d'hépatogastro-entérologie : les Drs Céline Roman, Bertrand Roquelaure, Marie Edith Coste, Isabelle Deneux et le Pr. Sarles pour leur aide et leur compréhension qui m'ont permis durant mon clinicat d'aller régulièrement au laboratoire.

Je remercie l'APHM pour son soutien financier par l'octroi de deux AORC, la Fondation santé, sport et développement durable de l'Université d'Aix-Marseille et l'ADEREM pour leur aide et leur support financier.

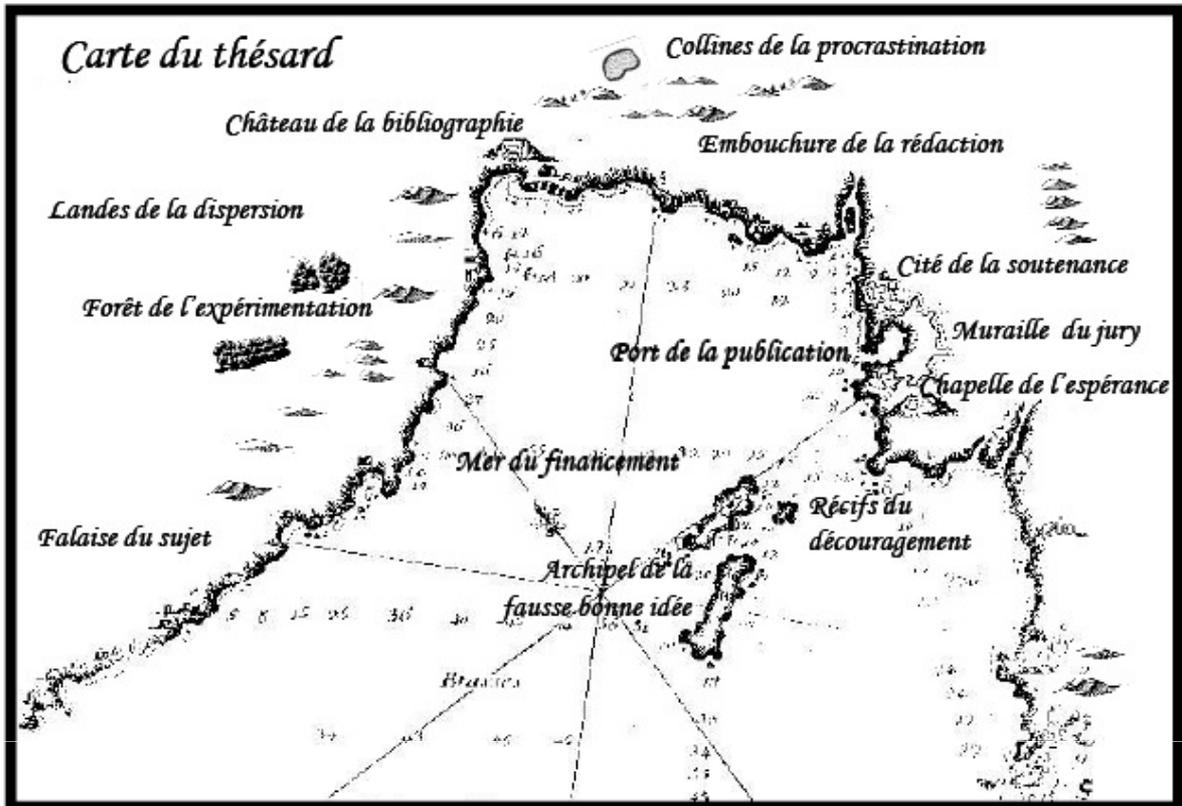
Je remercie le Pr. Sarles, le Pr. Chabrol et le Pr. Tsimaratos pour leur soutien et leur aide.

Je remercie les nombreuses relectrices de ce travail: Anne, Catherine, Maman, Suzanne, Nathalie, Imane. Merci de vos relectures attentives et du temps passé sur ce manuscrit. Compte tenu qu'après chaque relecture il semblait rester des fautes, j'ai élaboré une théorie de la génération spontanée des fautes dans les manuscrits de thèse.

Je remercie tous mes amis fidèles à travers les années et la distance, collègues et internes. Pour ces derniers je m'excuse des relèves tardives pour cause de manip au labo.

En ces instants un peu solennels, on se retourne sur son passé et je m'aperçois de tous ce que je dois à ma famille et belle famille, à Pierre et Julien, mes frères, à Marie ma sœur, à mes parents. Que ce travail soit un témoignage de mes remerciements pour tous ces moments partagés qui donnent un sens à l'existence, de mon affection et de mon amour.

Je dédicace ce travail à Anne mon aimée, car si comme l'a dit Hegel « rien de grand n'est fait dans le monde sans passion », c'est l'amour qui nous pousse à aller toujours plus loin. Merci Anne c'est grâce à toi et avec toi que j'avance sans crainte.



Merci à tous ceux qui m'ont accompagné le long de toutes les étapes de ce périple.

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	3
Figures	3
Tableaux	4
AVANT PROPOS	5
PREMIERE PARTIE	6
LES DIARRHEES GRAVES REBELLES CONGENITALES	7
I- Diarrhées congénitales par anomalies de la différenciation et de la polarisation des entérocytes	10
1- Atrophies microvillositaires	10
2- Dysplasies épithéliales	11
3- Déficit en alpha6-beta4 integrine	11
4- Diarrhées syndromiques ou syndrome tricho-hépto-entérique	12
II- Anomalies de la différenciation des cellules entéro-endocrines	12
1- Diarrhées congénitales avec malabsorption	12
2- Déficit en pro-hormone convertase 1	13
III- Anomalies de la modulation de la réponse immunitaire intestinale ou entéropathies auto-immunes (EAI)	13
1- EAI de type 1 ou IPEX	13
2- EAI de type 2 ou IPEX like	14
3- EAI de type 3	14
4- Autres pathologies	14
IV- Diarrhées graves rebelles non classées	15
1- Atteinte de la chaîne respiratoire	15
2- Déficit en Phospho-mannose-isomérase ou CDG-Ib	15
LES DIARRHEES SYNDROMIQUES OU SYNDROME TRICHO-HEPATO-ENTERIQUE	17
Mise au point clinique sur les DS/THE	20
Mutations et corrélation génotype/phénotype	22
Evolution	22
LE COMPLEXE SKI	24
Historique	24
L'exosome cytoplasmique	25
Fonctions de l'exosome cytoplasmique	26
Maladies liées à une altération de l'exosome chez l'homme	29
Maladies acquises	29
Maladies constitutionnelles	30

Le Complexe SKI chez la levure et chez l'homme	32
Constitution	32
Localisation	32
Composants du complexe SKI	33
Conclusion	37
SECONDE PARTIE	38
CARACTERISATION DES BASES MOLECULAIRES DU SYNDROME DS/THE	39
Constitution d'une collection d'ADN et de cellules de patients atteints de syndrome DS/THE	39
Caractérisation des bases génétiques des DS/THE	40
Recherche d'une région d'homozygotie	40
Exploration de la région en 5q et implication de <i>TTC37</i>	41
Caractérisation du second locus	44
Conclusion	45
ETUDE FONCTIONNELLE	46
Matériel et méthode	47
Etudes des transcrits	47
Etude de la localisation cellulaire	48
Résultats	50
Expression des transcrits	50
Etude de la localisation cellulaire de <i>TTC37</i> et de <i>SKIV2L</i>	52
Etude de la localisation en Immunocytologie	53
Discussion	55
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	57
REFERENCES	66
ANNEXES	81
Financement	81
Articles et présentations issus de ce travail de thèse	82

Liste des tableaux et figures

Figures

PARTIE 1

Introduction : diarrhées graves rebelles congénitales

Les Diarrhées syndromiques ou syndrome Tricho-hépto-Entérique

1. Patiente présentant une DS/THE à 8 mois
2. Dysmorphie faciale de patients ayant une DS/THE due à des mutations de *TTC37* ou de *SKIV2L*
3. Courbe Kaplan-Meier de la cohorte Française (Survie et sevrage)

Le Complexe SKI

4. Schéma de l'exosome chez la levure
5. Schéma du complexe SKI chez la levure
6. Schéma de la structure de Ski2 et de Mtr4 chez la levure

PARTIE 2

Caractérisation des bases moléculaires du syndrome DS/THE

7. Arbres généalogiques des 7 familles initialement incluses dans la collection de prélèvements biologiques
8. Analyse de locus homozygote pour les familles NAI, ORN et ZET
9. Résultats de la recherche de régions d'homozygotie dans la famille ZET avec les localisations de *SKIV2L*, *TTC37* et *WDR61*
10. Schéma des gènes *TTC37* ou *SKIV2L* humain

Etude fonctionnelle

11. Niveau d'expression des transcrits de *TTC37* sur un panel de tissus sains
12. Niveau d'expression des transcrits de *TTC37*, *SKIV2L* et *XRNI* dans des cellules lymphoblastoïdes issues de patients DS/THE
13. Transfection de cellules HUVEC avec un plasmide codant pour *TTC37* /GFP
14. Marquage anticorps monoclonaux anti-*TTC37* « maison » sur cellules lymphoblastoïdes contrôles
15. Immunohistochimie sur épithélium digestif avec les anticorps anti-*SKIV2L*, anti-*TTC37* et anti-*WDR61*

Tableaux

PARTIE 1

Introduction : diarrhées graves rebelles congénitales

1. Comparaison et correspondance des classifications de Goulet, de Murch et de Canani
2. Diarrhées graves rebelles congénitales : Année de description clinique et année de découverte des gènes responsables

Les Diarrhées syndromiques ou syndrome Tricho-Hépto-Entérique (DS/THE)

3. Signes cliniques associés aux DS/THE
4. Caractéristiques cliniques des 48 patients ayant un DS/THE décrits à ce jour

Le Complexe SKI

5. Protéines et gènes de l'exosome chez l'homme, la levure et les archées
6. Orthologues de SKI2, SKI3, SKI8 (Arabidopsis, Levure, Drosophile, Homme)
7. Phénotypes observés dans les altérations du complexe SKI chez *Saccaromyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*

PARTIE 2

Caractérisation des bases moléculaires du syndrome DS/THE

8. Caractéristiques cliniques des 8 premiers patients inclus dans la collection DS/THE
9. Cohorte Française
10. Analyse de locus homozygote dans les familles NAI, ORN et ZET : régions avec un Lod Score >5
11. Gènes situés sur le chromosome 5 dans la région d'homozygotie 5q13-q15
12. Caractéristiques cliniques et mutations des patients de la publication de Hartley et Coll.
13. Récapitulatif des caractéristiques cliniques et génétiques de la cohorte française de patients ayant un DS/THE
14. Signes cliniques des patients présentant un DS/THE selon la présence ou l'absence de mutation dans *TTC37*

Etude fonctionnelle

15. Génotypes des patients inclus dans l'analyse du transcriptome
16. Niveau d'expression de *TTC37*, *SKIV2L* et *XRNI* dans les cellules lymphoblastoïdes de patients DS/THE, d'apparentés hétérozygotes et de témoins
17. Transcrits dont l'expression est modifiée chez les 5 patients ayant des mutations de *TTC37*
18. Transcrits dont l'expression est modifiée chez 8 patients atteints de syndrome THE

Avant Propos

J'ai eu connaissance des diarrhées syndromiques (ou syndrome tricho-hépat-enterique) lors de mon premier choix d'interne en pédiatrie à Marseille en 2003, quand j'ai eu l'occasion de prendre en charge un patient dans le service du Pr Sarles. Ce syndrome avait été décrit depuis moins de 10 ans et la réalité même de son existence était parfois remise en cause. Trois ans plus tard, nous nous sommes lancés à la recherche des bases moléculaires de ce syndrome qui semblait être d'origine génétique du fait de l'existence de plusieurs familles consanguines et de fratrie d'enfants atteints. Ce mémoire rapporte les résultats de ce travail : il comporte une première partie constituée d'une revue bibliographique sur les diarrhées congénitales et sur le complexe SKI et une seconde partie rapportant les résultats de notre travail expérimental.

Les approches mises en œuvre ici pour la caractérisation des gènes en cause sont basées sur la recherche de gènes candidats et l'analyse de liaison. Ces approches, classiquement utilisées depuis les années 90, ont permis la découverte de nombreux gènes responsables de pathologies humaines. En effet, le nombre de gènes impliqués dans des pathologies constitutionnelles a triplé entre 2000 et 2009. Ces techniques tendent à devenir historiques et seront très probablement totalement remplacées à l'avenir par les techniques d'analyse de séquence à haut débit, jusqu'à description complète du mutome humain.

Cette étude est le fruit d'une collaboration de tous les centres de gastro-entérologie pédiatrique français ainsi que des liens que nous avons établis avec le service de génétique du Pr Levy. Enfin, ce travail n'aurait pas été possible sans les patients et leur famille qui nous ont fait confiance et dont nous espérons, par le biais de ce travail et de ceux à venir, avoir amélioré la prise en charge.

Première Partie

Les diarrhées graves rebelles congénitales

L'OMS définit la diarrhée comme étant l'émission de selles molles ou liquides à une fréquence anormale pour l'individu (<http://www.who.int/topics/diarrhoea/fr/>). On parle de diarrhée prolongée ou chronique lorsque celle-ci persiste plus de 14 jours et s'accompagne d'une perte pondérale ou d'un déficit de croissance (Bhuta et coll. 2004). La persistance de la diarrhée peut conduire à la dénutrition voire au décès. Les diarrhées prolongées du nourrisson, survenant dans la première année de vie, peuvent signifier une maladie congénitale et posent un problème de prise en charge et de diagnostic. Dans les cas les plus sévères, la prise en charge nécessite des techniques d'alimentation artificielle telle que la nutrition entérale, mode d'alimentation ne passant pas par la bouche mais utilisant l'axe digestif, ou une nutrition parentérale c'est à dire utilisant la voie veineuse. La nutrition parentérale a révolutionné la prise en charge des diarrhées chroniques en permettant des survies prolongées. Elle consiste à apporter par voie veineuse, tout ou partie des nutriments nécessaires à la croissance et à l'homéostasie lorsque que l'axe digestif n'est pas utilisable. Un accès veineux de gros calibre (voie centrale) est nécessaire. La réalisation de la première nutrition parentérale date de 1967 (Spencer et Compher 2001) et depuis, de nombreux progrès ont été réalisés, tant au niveau des techniques d'administration que de l'élaboration des solutés de nutrition. Ces progrès ont permis de diminuer le risque de complications et de carences (Koletzko et coll. 2005). Les complications sont de type infectieux, métabolique, mécanique, hépatique et peuvent conduire au décès (Knafelz et coll. 2003). En cas de nutrition parentérale prolongée, la nutrition peut être organisée à domicile (Colomb et coll. 2007). L'administration se fait généralement la nuit, mais peut également être continue. La

nutrition parentérale a transformé le pronostic des maladies digestives mais au prix d'une lourde morbi-mortalité.

Les diarrhées chroniques du nourrisson avec indication d'un support nutritionnel entéral ou parentéral, se répartissent en deux groupes : les diarrhées graves prolongées (DGP), d'évolution généralement favorable et causées par des problèmes infectieux, allergiques ou de malabsorption spécifique, et les diarrhées graves rebelles (DGR) qui correspondent à des diarrhées résistantes aux traitements habituels et nécessitant une nutrition parentérale (Goulet 2001, Goulet et Phillips 2008). Une classification de ce dernier groupe des DGR a été proposée dès 1997 sur la base de l'étude de 47 enfants présentant une DGR (Goulet et coll. 1998). Cette classification, qui repose sur l'expression clinique et les examens anatomopathologiques de la muqueuse digestive, décrit 3 groupes : les DGR par activation lymphocytaire, les DGR avec anomalie de la muqueuse intestinale et les DGR dites syndromiques ou syndromatiques.

Murch, en 2002, a proposé une autre classification des entéropathies de l'enfant, basée sur deux grands groupes : les diarrhées persistantes d'une part, qui correspondent approximativement aux DGP mais qui comprennent aussi certains déficits immunitaires, les inflammations, les troubles de la mobilité, les déficits d'absorption spécifique et les entéropathies secondaires à une maladie héréditaire du métabolisme et d'autre part, les DGR dans lesquelles sont classés les déficits primaires de l'épithélium, les entéropathies immuno-médiées et les diarrhées d'étiologie inconnue.

Plus récemment, en 2010, en se basant sur les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, Canani et coll. ont proposé

de classer les entéropathies selon le type de cellules digestives atteintes. Dans cette classification, 4 grands groupes sont individualisés :

- les anomalies de l'absorption, du transport des nutriments et des électrolytes
- les anomalies de la différenciation et de la polarisation des entérocytes
- les anomalies de la différenciation des cellules entéro-endocrines
- les anomalies de la régulation de la réponse immunitaire intestinale.

Il est évident que ces trois classifications se superposent globalement (Tableau 1). Cependant, l'existence de ces différentes propositions souligne la difficulté de classer les diarrhées congénitales. En effet, dans certains cas, la diarrhée est un des signes constitutifs de la pathologie, dans d'autres, elle est secondaire et survient sur un tube digestif normal, comme dans les atteintes immunitaires. Il faut noter que la majorité des diarrhées chroniques du nourrisson ne sont pas d'origine génétique (Goulet et al. 2001, Passariello et al. 2010) mais plutôt acquises comme dans les cas de suites de résection intestinale (« grêle court »), ou de complications infectieuses ou encore dans certaines formes d'allergies.

La classification des diarrhées congénitales est donc complexe puisqu'on les retrouve dans de nombreux tableaux cliniques. Une recherche par mots clés sur le portail OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) donne 126 réponses pour le terme *children diarrhea* et 18 pour *children intractable diarrhea*. Une recherche sur le portail Orphanet (<http://www.orpha.net>) donne 113 résultats pour *Malabsorption/chronic diarrhea/steatorrhea* et cite de nombreuses pathologies où la diarrhée n'est qu'un signe clinique très secondaire. La classification de Canani se veut rationnelle, en essayant de se rapprocher de la physiopathologie mais elle conduit à la constitution d'un groupe hétérogène, celui des « anomalies de l'absorption, du transport des nutriments et des électrolytes » qui comprend 19

Tableau 1 : Comparaison et correspondance des classifications de Goulet, de Murch et de Canani (DGR : Diarrhées graves rebelles, DGP : Diarrhées graves prolongées)

Classification de Goulet al. 1997	Classification de S. Murch (2002)	Classification de Canani et al. 2010
DGP	Diarrhées persistantes	Anomalies de l'absorption, du transport des nutriments et des électrolytes
DGR avec anomalie congénitale de la muqueuse DGR dite syndromique ou syndromatique	Défaut primaire de l'épithélium DGR d'étiologie inconnue	Anomalies de la différenciation et de la polarisation des entérocytes
		Anomalies de la différenciation des cellules entero-endocrines
DGR par activation lymphocytaire	Diarrhée immunomédiée-autoimmune	Anomalies de la modulation de la réponse immune intestinale

maladies alors que les 3 autres groupes réunis n'en contiennent que 8. De plus, elle inclut certaines maladies causées par des anomalies de l'absorption, de l'assimilation des nutriments et des ions qui ne donnent pas de diarrhées : en effet sur les 42 anomalies des transporteurs intestinaux décrites par Martin et Wright en 2008, 16 maladies ne sont pas associées à une diarrhée. Par ailleurs, le groupe «anomalies de la différenciation et de la polarisation des entérocytes» est assez hétérogène au niveau moléculaire car les gènes impliqués ne semblent pas altérer les mêmes voies métaboliques. Enfin, dans le cas des diarrhées syndromiques, l'atteinte digestive, bien qu'étant au premier plan, n'est pas le seul signe clinique. A l'inverse, la classification reposant sur l'existence d'une DGR est restreinte aux diarrhées graves et donc plus proche de la pratique clinique mais exclut de fait, les diarrhées congénitales ne nécessitant pas de nutrition parentérale.

Nous détaillons maintenant la présentation des principales Diarrhées Graves Rebelles.

1- Diarrhées congénitales par anomalies de la différenciation et de la polarisation des entérocytes (DGR avec pathologie congénitale de la muqueuse digestive)

1- Atrophies microvillositaires (OMIM : 251850)

Individualisée en 1978, cette diarrhée se présente sous deux formes: l'une, à début néonatal précoce, avec une diarrhée sévère entraînant le décès en absence de prise en charge et l'autre, à début plus tardif et de sévérité modérée. L'évolution se fait vers la parentérolo-dépendance et nécessite parfois une greffe de l'intestin, même si quelques cas de sevrage de la nutrition parentérale sont connus. Le trait distinctif est l'absence de microvillosité au niveau des entérocytes et la présence d'inclusions cytoplasmiques (Ruemmele et coll. 2006). La cause de cette pathologie

est une altération du gène *Myo5B* qui code pour une protéine entrant dans la constitution du cytosquelette (Muller et coll. 2008).

2- Dysplasies épithéliales (OMIM : 613217 et OMIM : 270420)

Décrite pour la première fois en 1994, la dysplasie épithéliale a été initialement définie comme une DGR isolée à début néonatal nécessitant une nutrition parentérale. L'élément caractéristique est la présence de « houpette » à l'examen anatomopathologique, aspect particulier de la biopsie intestinale causé par l'hyperplasie de l'épithélium de surface avec des empilements d'entérocytes ou une extrusion de ce dernier dans la lumière digestive (Goulet et coll. 2008). Secondairement, une forme syndromique associant une atrésie des choanes, une atrésie anale, une dysmorphie et des anomalies des cheveux y a été rattachée (Goulet et coll. 2007). Les gènes impliqués sont *EPCAM* pour la forme non syndromique (Sivagnanam et coll. 2008, Salomon et coll. 2011) et *SPINT2* pour la forme syndromique (Heinz-Erian et coll. 2009). *EPCAM* code pour une protéine de fonction inconnue mais qui est impliquée dans la voie des cadherine/catenine. Par ailleurs, une délétion de la partie 3' terminale d'*EPCAM* induisant une dérégulation de *MSH2* est responsable d'un autre syndrome, le syndrome de Lynch, dans lequel il existe une prédisposition aux cancers digestifs (Ligtenberg et coll. 2009). *SPINT2* code pour une protéine transmembranaire avec deux domaines Kunitz qui sont des domaines inhibiteurs de protéase (Heinz-Erian et coll. 2009).

3- Déficit en alpha6-beta4 integrine

Décrite en 1999 par Lachaux et coll., cette maladie est une variante du syndrome d'épidermolyse jonctionnelle bulleuse avec syndrome d'atrésie du pylore (Chung et Uitto 2010). On note une diarrhée grave néonatale avec une atrésie du

pylore mais il n'y a pas d'atteinte cutanée. L'aspect anatomopathologique met en évidence une desquamation de la muqueuse intestinale. Cette maladie évolue par palier et s'améliore avec le temps. Elle est causée par des mutations d'*ITGB4* qui code pour une intégrine impliquée dans les liaisons cellulaires (Salvestrini et coll. 2008). Ce syndrome est rare avec seulement 2 familles rapportées dans la littérature.

4- Diarrhées syndromiques ou syndrome tricho-hépto-entérique (OMIM 222470, 614602)

Il s'agit de la pathologie que nous avons étudiée et qui sera détaillée dans les chapitres suivants. Sa place n'est pas bien établie dans les classifications du fait de l'absence d'anomalie ultra-structurale, que ce soit en microscopie optique ou électronique, ce qui a longtemps rendu difficile le diagnostic de certitude. Les DS/THE sont donc généralement isolées dans leur propre groupe (Goulet et coll. 2001 et Murch 2002)

II- Anomalies de la différenciation des cellules entéro-endocrines

1- Diarrhées congénitales avec malabsorption (OMIM : 610370)

La première description de cette maladie date de 2006 (Wang et coll. 2006). Il s'agit de patients présentant une diarrhée néonatale isolée avec des tableaux de déshydratation sévère nécessitant une nutrition parentérale. La diarrhée congénitale avec malabsorption est causée par des mutations du gène *NEUROG3* qui code pour un facteur exprimé dans les cellules progénitrices endocrines. L'examen anatomopathologique des biopsies intestinales retrouve une paucité ou une absence des cellules entéro-endocrines. Un diabète peut être présent à la naissance (Rubio-Cabeza et coll. 2011) ou apparaître secondairement (Wang et coll. 2006) selon le type de mutation. A ce jour, 5 patients ont été décrits.

2- Déficit en pro-hormone convertase 1 (OMIM : 600955)

Cette maladie est également très rare avec 3 patients décrits à ce jour (Jackson et coll. 1997, Jackson et coll. 2003, Farooqi et coll. 2007). Le tableau initial est essentiellement un tableau d'obésité avec un déficit endocrinien (hypogonadisme, hypoadrénalisme). Si le premier patient n'avait que quelques troubles du transit, les 2 suivants présentaient une diarrhée grave nécessitant une nutrition parentérale de durée variable. Le trait dominant est celui d'une hyperphagie avec une obésité. Cette maladie est causée par des mutations du gène *PCSK1*. Ce dernier code pour une enzyme impliquée dans l'activation des pro-hormones.

III- Anomalies de la modulation de la réponse immunitaire intestinale ou entéropathies auto-immunes (EAI)

La majorité des patients atteints de déficits immunitaires constitutionnels (SCID, Wiskott-Aldrich, CVID, APECED, OMENN ...) ou secondaires peuvent présenter une diarrhée prolongée. Cependant, les entéropathies auto-immunes se distinguent des autres formes par la précocité de l'atteinte digestive et la présence d'une infiltration de cellules mononuclées dans la *lamina propria*. Dans la plupart des cas, on note la présence d'anticorps dirigés contre un antigène de 75 kDa (anti AIE-75). Selon la classification de Ruemmele et coll en 2008, on distingue 3 catégories : les Entéropathies auto-immunes (EAI) de type 1, 2 et 3.

1- EAI de type 1 ou IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy auto-immune Enteropathy X-linked; OMIM : 601410)

Il s'agit d'un syndrome lié à une mutation de *FOXP3* qui code pour la Forkhead box protéine P3 et induit des altérations des fonctions modulatrices et effectrices des lymphocytes T. Il s'agit d'une maladie liée au chromosome X, expliquant la surreprésentation des garçons atteints. Outre la DGR, les patients

présentent des endocrinopathies (diabète, hypothyroïdie), des atteintes cutanées (dermatite atopique), et des atteintes immunologiques. Le traitement consiste en une immunosuppression, voire une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Ruemmele et coll. 2008, Hannibal et Torgerson 2011).

2- EAI de type 2 ou IPEX like

Le tableau clinique est identique à celui du syndrome IPEX mais sans mutation de *FOXP3*. Le ou les gènes à l'origine de ce syndrome sont inconnus mais pourraient être impliqués dans la régulation de la production des lymphocytes T (Ruemmele et coll. 2008). Chez un patient, une mutation de *CD25*, codant pour la chaîne alpha de l'interleukine 2, a été rapportée (Caudy et coll. 2007). Ce groupe est probablement hétérogène d'un point de vue génétique.

3- EAI de type 3

Il s'agit de patients présentant une DGR avec des anticorps anti AIE-75 mais qui ne présentent pas d'atteinte extra digestive contrairement aux EAI de type 1 et de type 2 (Ruemmele et coll. (2008). Aucun gène n'a pour l'instant été impliqué dans ce groupe.

4- Autres pathologies

Canani et coll. ont également classé dans le groupe "anomalies de la modulation de la réponse immune intestinale" le syndrome APECED pour « autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy ». Ce syndrome est causé par des mutations du gène *AIRE* codant pour un facteur de transcription impliqué dans la tolérance immunitaire. Il est caractérisé surtout par une poly-endocrinopathie et une susceptibilité aux candidoses.

IV-Diarrhées graves rebelles non classées

1- Atteinte de la chaîne respiratoire

Les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire entraînent des maladies avec des tableaux cliniques divers, parmi lesquels une atteinte digestive est possible. Cette atteinte peut comprendre une diarrhée avec des tableaux histologiques variés. Dans ces formes avec diarrhée, il n'y a pas de signe d'orientation spécifique et le diagnostic clinique est souvent un diagnostic d'élimination. La confirmation diagnostique se fait par l'exploration biochimique de la chaîne respiratoire et par l'analyse en biologie moléculaire des 37 gènes mitochondriaux et des nombreux gènes nucléaires connus comme étant impliqués dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Horn et Lavine 2004, Bonnenmain et coll. 2004, Murayama et coll. 2007).

2- Déficit en Phospho-mannose-isomérase ou CDG-Ib (OMIM 602579)

Parmi les désordres de la glycosylation, le CDG-Ib présente un tableau relativement homogène avec une atteinte hépatique et intestinale, un hyperinsulinisme et des thromboses. La diarrhée peut être congénitale, elle est de sévérité variable et nécessite une nutrition parentérale. Il existe un traitement par mannose par voie orale qui améliore la symptomatologie. Cette maladie est causée par des mutations de *MPI* qui code pour la Mannose-6-phosphate isomérase (DeLonlay et Seta 2009). On peut rapprocher de ce tableau les 3 patients décrits par Murch et coll. en 1996. Ces patients présentaient un déficit congénital en sulfate d'héparane, un polysaccharide constituant de la matrice extracellulaire, associé à une diarrhée grave rebelle.

Cette revue montre l'hétérogénéité des causes moléculaires de DGR. Du fait de la nécessité d'une nutrition parentérale prolongée et de la prise en charge en milieu hospitalier, les DGR sont assez bien étudiées. Les années 2000 ont été très riches sur le plan de la compréhension des bases physiopathologiques, avec l'implication d'un grand nombre de gènes responsables de plusieurs de ces syndromes (Tableau 2). Ce sont les descriptions nosologiques des années 90 qui ont rendu ces découvertes possibles en permettant la constitution de cohortes de patients. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce courant, puisque l'objectif en a été de mettre en évidence les bases physiopathologiques des diarrhées syndromiques.

Tableau 2 : Diarrhées graves rebelles congénitales : années de description clinique et année de découverte des gènes responsables

	Année de description	Gene responsable	Année de découverte des gènes responsables	Stratégie
<i>Atrophie microvillositaire</i>	1978	<i>MYO5B</i>	2008	Recherche de région homozygote
<i>IPEX</i>	1982	<i>FOXP3</i>	2001	Analyse de liaison
<i>Dysplasie épithéliale</i>	1994	<i>EPCAM</i>	2008	Recherche de région homozygote
<i>Diarrhée syndromique</i>	1994	<i>TTC37</i> <i>SKIV2L</i>	2010 2012	Recherche de région homozygote Gène candidat
<i>Déficit en prohormone convertase 1</i>	1997 2003 (Variant digestif)	<i>PCSK1</i>	1997	Gène candidat
<i>Dysplasie épithéliale syndromique</i>	1999	<i>SPINT2</i>	2009	Analyse de liaison
<i>Déficit en alpha6-beta4 integrine (variant digestif)</i>	1999	<i>ITGB4</i>	2008	Gène candidat
<i>Diarrhée congénitale avec malabsorption</i>	2006	<i>NEUROG3</i>	2006	Gène candidat

Les Diarrhées syndromiques ou syndrome Tricho-Hépat-Entérique

Les diarrhées syndromiques ou syndrome tricho-hépat-entérique (DS/THE OMIM : [222470](#) et [614602](#), ORPHA84064) sont un syndrome associant : une diarrhée grave rebelle, des anomalies des cheveux dit « laineux », un retard intra utérin et une dysmorphie. On peut également noter, de manière inconstante, une atteinte hépatique et des anomalies de l'immunité.

Le DS/THE fait partie du groupe des diarrhées graves rebelles de l'enfant (ORPHA73014), un ensemble de pathologies caractérisées par la persistance d'une diarrhée chronique en dépit de l'instauration d'une nutrition parentérale au long cours. Cette prise en charge thérapeutique a permis de réduire drastiquement la mortalité liée à ces pathologies (Goulet 2001).

Décrites pour la première fois en tant qu'entité en 1994 par Girault et coll. avec une cohorte de 8 patients, l'histoire des diarrhées syndromiques a, par la suite, été marquée par une multiplication des dénominations : « Syndrome de Stankler », « Diarrhées graves rebelles avec anomalies phénotypiques et déficit immunitaire », « Syndrome Tricho-Hépat-Entérique », « Diarrhées syndromiques », « Diarrhées syndromatiques », « Diarrhées phénotypiques », « Diarrhées graves rebelles avec dysmorphie faciale, trichorhexis nodosa et cirrhose », « Hémochromatose néonatale avec diarrhées graves rebelles et anomalie des cheveux », « Anomalies phénotypiques et déficit immunitaire », « Diarrhées chroniques et hyperpigmentation ». Toutes ces différentes dénominations sont retrouvées dans la littérature. Des tentatives plus ou moins fructueuses de regrouper les différentes entités ont eu lieu. Dès 1994, la fratrie décrite en 1982 par Stankler et coll. (Syndrome de Stankler) a été rattachée aux diarrhées syndromiques. En 1997,

Verloes décrit un nouveau syndrome cliniquement voisin des diarrhées syndromiques : le syndrome tricho-hépato-entérique (THE) qui ne diffère des diarrhées syndromiques que par l'atteinte hépatique, partageant par ailleurs les mêmes signes cliniques. Ces deux syndromes ont finalement été regroupés en une seule entité en 2007 (Fabre et coll. 2007) et la dénomination retenue est DS/THE. Au total, en 2008, 25 patients avaient été rapportés dans la littérature scientifique comme ayant l'un ou l'autre syndrome (Stankler et coll. 1982, Girault et coll. 1994, Verloes et coll. 1997, De Vrie et coll. 2000, Landers et coll. 2003, Barabino et coll. 2004, Dweikat et coll. 2007, Fabre et coll. 2007, Goulet et coll. 2008).

En se basant sur la description clinique de ces 25 patients, on retrouve 7 signes cliniques associés au DS/THE dont 3 sont constants : une diarrhée grave rebelle, des anomalies des cheveux et une dysmorphie (Figure 1) ; 2 sont présents dans plus de 90% des cas : un retard de croissance intra utérin et un déficit immunitaire ; 2 sont présents chez la moitié des patients : des anomalies cutanées et une atteinte hépatique.

La prise en charge clinique des DS/THE, comme de toutes les diarrhées graves rebelles, nécessite généralement une nutrition parentérale au long cours, du fait de l'importance de la diarrhée, de la malabsorption et parfois des troubles de l'oralité. Quelques rares patients peuvent être sevrés, après quelques mois, voire quelques années de nutrition parentérale, mais la plupart restent dépendants, toute leur vie, de la nutrition parentérale. Par ailleurs, une supplémentation en immunoglobulines est parfois proposée, notamment s'il existe un déficit en immunoglobulines. Cependant, la durée et les modalités de cette supplémentation ne sont pas consensuelles et dépendent des pratiques des centres de prise en charge. Le terrible pronostic de cette pathologie (5 patients sur les 8 de la série initiale de

Figure 1 : Patiente présentant une DS/THE à 8 mois



Girault et coll. sont décédés entre 20 et 58 mois de vie) s'est amélioré avec les progrès de la nutrition parentérale (Barabino et coll. 2004, Martinez Vinson 2004). Cependant, aucun traitement spécifique n'est actuellement disponible et, si la nutrition parentérale permet des survies prolongées, elle est grevée d'une lourde morbidité. Enfin, l'atteinte hépatique, qui peut préexister à la nutrition parentérale ou survenir plus tard dans la vie, nécessite une attention particulière car elle peut être aggravée par la nutrition parentérale au long cours.

Dès les premières descriptions, une origine génétique de type autosomique récessive était évoquée devant :

- Un sexe ratio à 0.5 (14 filles pour 12 garçons)
- L'absence de transmission de parents à enfant
- La notion de 3 fratries présentant plusieurs individus atteints
- La notion de consanguinité dans 8 familles sur 24
- Une absence d'anomalie au caryotype lorsque ce dernier était réalisé

En résumé, en 2008, les DS/THE constituaient un syndrome rare, d'origine vraisemblablement génétique, de transmission autosomique récessive et présentant une lourde morbi-mortalité. En l'absence de critères biologiques ou histologiques spécifiques, le diagnostic restait clinique.

Nous avons souhaité reprendre la description clinique de tous les cas récemment publiés ainsi que des cas nous ayant été adressés pour diagnostic moléculaire, afin de préciser le phénotype et de rechercher d'éventuelles corrélations avec les génotypes.

Mise au point clinique sur les DS/THE

En se basant sur la description de 48 patients (44 patients décrits dans des publications et 4 reçus dans le laboratoire pour analyse génétique mais n'ayant pas été rapportés), nous avons retrouvé les 7 signes cliniques précédemment décrits et repéré deux autres signes: une cardiopathie congénitale et des anomalies morphologiques des plaquettes. Les signes cliniques sont présentés dans le tableau 3.

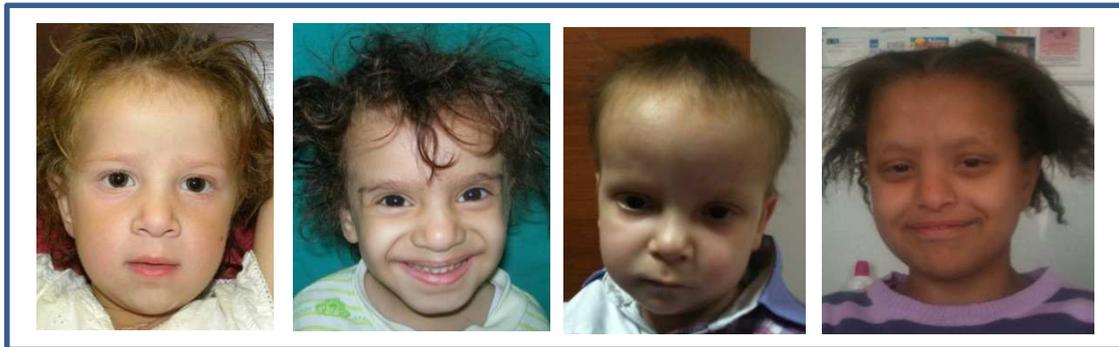
Signes constants (entre parenthèses est donné le nombre d'enfants présentant ce signe sur le nombre total de cas) :

Diarrhée grave rebelle (48/48): Tous les enfants présentent une diarrhée grave rebelle néonatale. Le syndrome DS/THE est presque toujours diagnostiqué dans les services de nutrition pédiatrique en raison des problèmes de malnutrition ou de diarrhée. L'âge de début est variable, des premiers jours à 32 semaines de vie. La plupart des enfants sont mis sous nutrition parentérale au cours de leur suivi. L'examen anatomopathologique des biopsies digestives révèle peu d'anomalies : elles sont normales (7/44), ou présentent une atrophie villositaire modérée ou sévère. Il n'y pas de signes de dysplasie épithéliale. Enfin, on peut noter des aspects de colite ou de gastrite (16/22).

Anomalies des cheveux (48/48) : Il s'agit d'un des signes les plus spécifiques et les plus constants. Les cheveux sont dit laineux (sensation tactile). Ils sont cassants, fragiles, incoiffables. Dans la majorité des cas, on peut trouver des trichorhexis nodosa à l'examen microscopique (35/39).

Dysmorphie (47/47) : La dysmorphie classique est un front large, une racine du nez large, un hypertélorisme. La dysmorphie peut s'accroître avec le temps (Figure 2).

Figure 2 : Dysmorphie faciale de patients présentant une DS/THE due à des mutations de *TTC37* (a) ou de *SKIV2L* (b,c et d)



a

b

c

d

Tableau 3 : Signes cliniques associés au DS/THE

Constants	Fréquents	Inconstants (50%)	Rares (<20%)
-Diarrhée grave rebelle -Dysmorphie -Anomalies des cheveux	-RCIU -Anomalies immunitaires	-Atteinte hépatique -Atteinte cutanée	-Anomalies cardiaques congénitales -Anomalies des plaquettes

Signes fréquents

RCIU (31/46) : La majorité des enfants présente un poids de naissance inférieur au 10ème percentile (30/41) voire inférieure au 3ème percentile (27/41). De plus, 19 enfants sont nés prématurément avec, dans certains cas, recours à une césarienne pour RCIU.

Anomalies immunitaires (39/44) : Bien que fréquent, ce signe est assez mal connu. En effet, les analyses effectuées sont rarement identiques d'un centre à l'autre. Les signes les plus fréquemment rencontrés sont un taux bas d'immunoglobulines (24 enfants), une absence de réponse aux antigènes vaccinaux (14 enfants), un gammopathie oligoclonale à IgA (3 patients). Du fait de cette anomalie, certains enfants nécessitent une supplémentation en immunoglobulines de manière temporaire ou au long cours. Un tiers des patients (5/15) ont présenté un syndrome d'activation macrophagique.

Signes inconstants

Atteinte hépatique (23/44) : L'atteinte hépatique n'est retrouvée que chez la moitié des patients. Elle peut être sévère allant jusqu'à la cirrhose (18 patients) et conduisant au décès. Parfois, il n'est noté qu'une hépatomégalie isolée ou des anomalies des constantes biologiques hépatiques. Il est difficile de déterminer si cette atteinte est primitive ou secondaire à la nutrition parentérale. Un enfant, ayant développé un hépatoblastome, a été décrit récemment (Bozzetti et coll. 2012).

Atteinte cutanée (18/36) : Cette atteinte peut devenir plus marquée avec le temps. Ces anomalies sont à type de tache dyschromique et de xérose.

Signes rares

Anomalies cardiaques congénitales (8/31) : Sept enfants ont présenté une atteinte cardiaque congénitale. Cette atteinte peut être variable (insuffisance aortique, sténose des artères pulmonaires, tétralogie de Fallot, défaut atrial ou ventriculaire).

Anomalies des plaquettes (5/21) : Décrite en 2010 pour la première fois, il s'agit d'anomalies morphologiques visibles au microscope électronique (Hartley et coll. 2010). Une majoration de la taille des plaquettes, fluctuantes dans le temps, peut être observée. Il n'y a pas d'anomalies fonctionnelles associées, c'est pourquoi ce signe est rarement recherché.

Autres signes : Certains signes n'ont été décrits que chez un ou deux patients et peuvent donc n'être que des associations fortuites. Ces signes sont : une hernie inguinale, une atrophie thymique, un petit rein, un syndrome de Perthes, un glaucome, une hypothyroïdie, un rein polykystique.

Mutations et corrélation génotype/phénotype

La nature des mutations et leurs effets sur l'expression des gènes sont décrits en détail dans la deuxième partie de ce mémoire. Aucune corrélation entre les phénotypes et les génotypes n'a pu être établie (Tableau 4).

Evolution

L'évolution à long terme des DS/THE dépend de la prise en charge de la diarrhée, du déficit immunitaire et de l'atteinte hépatique, si elle est présente. La seule cohorte bien caractérisée est la cohorte française. Sur les 15 patients nés entre 1992 et 2012 et chez qui un diagnostic de DS/THE a été porté (13 avec une confirmation moléculaire et 2 chez qui l'analyse génétique n'a pas pu être réalisée),

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques des 48 patients ayant un DS/THE décrits à ce jour

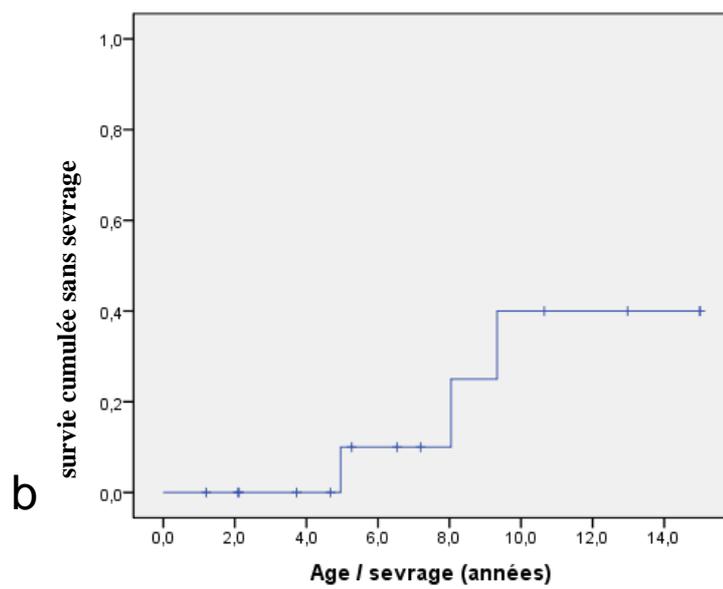
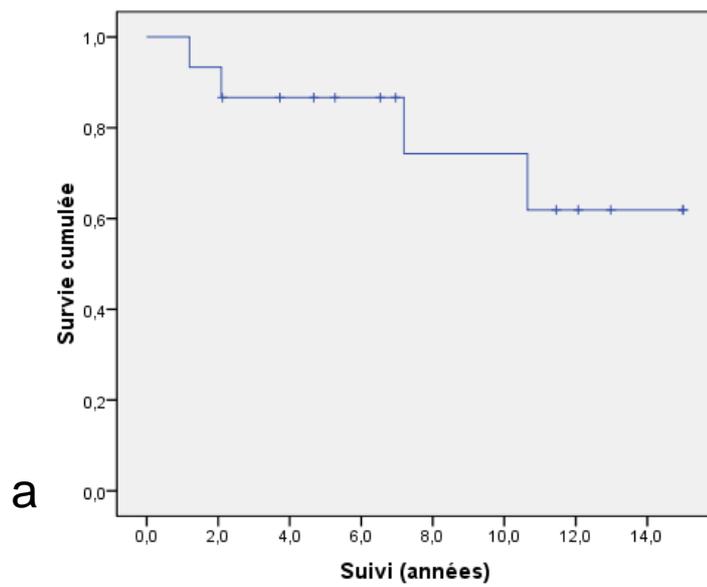
	total (n= 48)	Patients avec 2 mutations de <i>TTC37</i> (n=22)	Patients avec 1 mutation de <i>TTC37</i> (n=3)	Patients avec 2 mutations de <i>SKIV2L</i> (n=7)	Patients sans exploration génétique (n=16)	Patients avec la mutation récurrente de <i>TTC37</i> p.Trp936X (n=5)
Consanguinité	21/44	14/21	0/3	4/7	3/13	5/5
Prématurité	19/45	11/21	2/3	3/6	3/15	2/5
Sexe (F/M)	27/20	13/9	1/2	5/2	8/7	3/2
Poids de naissance moyen en g	1825 (780-3.580)	1906 (780-3580)	1715 (1345-2100)	1473 (1010-2000)	1896 (1410-3250)	1986 (1375-2400)
Diarrhée grave rebelle	48/48	22/22	3/3	7/7	16/16	5/5
Date de début de la diarrhée, moyenne en semaine	5.25 (1-32)	6.8 (1-32)	4	3.7 (1-4)	4.9 (1-24)	-
Dysmorphie faciale	47/47	22/22	3/3	6/6	16/16	5/5
Anomalies des cheveux	48/48	22/22	3/3	7/7	16/16	5/5
Trichorhexis nodosa	35/39	18/19	2/3	6/6	9/11	4/4
Anomalie de l'immunité	39/44	19/20	3/3	4/7	13/14	4/5
RCIU	31/46	12/21	2/3	5/7	12/15	5/5
Atteinte hépatique	23/44	11/19	0/3	3/6	9/16	2/3
Anomalie cutanée	18/36	9/19	0/2	¾	6/11	2/5
Anomalie de plaquettes	5/21	5/17	0/2	0/2	-	2/3
Anomalie cardiaque	8/31	5/18	1/2	1/3	1/8	2/5
Evolution (vivants/décédés)	18/30	5/17	0/3	2/5	11/5	3/2

cinq patients (33%) sont décédés à un âge moyen de 7.9 ans (1.2-18.5 ans) majoritairement de cause infectieuse. Trois patients ont pu être sevrés de la nutrition parentérale à un âge moyen de 7.4 ans (5-9.32 ans) (Figure 3). La majorité des patients présente une taille inférieure au 1er percentile (9/13), en dépit d'une prise en charge nutritionnelle optimale. Enfin 9 enfants sur 14 présentent un retard mental modéré. On peut noter que des patients ayant des phénotypes moins sévères que les patients français, en particulier sur le plan gastro-entérologique, ont été décrits dans la littérature, certains ne nécessitant pas de nutrition parentérale (Egritas et coll. 2009).

Une revue, reprenant l'ensemble de ces descriptions cliniques publiées dans la littérature, a été proposée à *Orphanet Journal Of Rare Disease* et est sous presse. Nous présentons en annexe le manuscrit dans sa forme définitive.

Figure 3 : Courbe Kaplan-Meier de la cohorte française

a :Survie, b :Sevrage



Le Complexe SKI

Les DS/THE étant causé par des altérations de deux des composants du complexe SKI, cofacteur de l'exosome cytoplasmique, nous faisons, dans les pages suivantes, une mise au point sur le complexe SKI et l'exosome cytoplasmique.

Historique

Quand elles sont infectées par deux virus à ARN double brin L-A et M, les levures de types *Saccharomyces cerevisiae* synthétisent une toxine létale pour les autres levures, tout en étant elles-mêmes protégées contre cette toxine : ce phénotype est nommé phénotype *Killer* (Berry et Bevan 1972). Le phénotype *superkiller* (SKI) est décrit chez des souches exerçant une toxicité accrue par majoration du taux de toxine produite comparé aux souches ayant le phénotype *killer* (Vodkin et coll. 1974, Schmitt et coll. 2002). En 1978, Toh-e et coll. montrent que le phénotype *superkiller* est causé par des anomalies de 4 gènes nucléaires différents qu'ils nomment : *SKI1*, *SKI2*, *SKI3*, *SKI4*. Ce nombre est porté à 8 en 1984 par Ridley et coll., puis réduit à 7 en 1989 quand Hougan et coll. prouvent que *Ski3* et *Ski5* correspondent à la même protéine.

Au décours des années 1990, le phénotype *superkiller* est relié à l'absence de répression de la traduction des ARNm viraux (Widner et coll. 1993). En parallèle, *Ski1* est identifiée comme étant en fait *Xrn1*, une exoribonucléase connue (Johnson et Kolodner, 1995) et les structures de *Ski3* et de *Ski8* sont décrites (Rhee et coll. 1989, Matsumoto et coll. 1993). En 1995, l'activité de dégradation des ARNm viraux en 5'-3' par *Ski1/Xrn1* et en 3'-5' par *Ski2/Ski3/Ski8* est caractérisée par Masison et coll. La découverte que *Ski1* d'une part, et *Ski2-Ski3*, *Ski6*, *Ski7* et *Ski8* d'autre part, codent pour des protéines impliquées dans deux voies métaboliques importantes pour

l'homéostasie cellulaire, différentes mais complémentaires, est suggérée par l'effet létal des doubles mutants (Johnson et Kolodner, 1995 et Anderson et Parker, 1998). Enfin, le lien entre les protéines Ski et l'exosome dont la fonction est la dégradation ARNm normaux et aberrants, est décrit en 1998 par Anderson et Parker (cette structure n'a rien à voir avec les exosomes vésicules qui sont des véhicules de transport ou d'exclusion de la cellule). Ce n'est qu'en 2000, que l'existence du complexe SKI in vivo est confirmée (Brown et coll. 2000) par des expériences de co-immunoprécipitation montrant que Ski2, Ski3 et Ski8 composent le complexe SKI. Après deux décennies, les pièces du puzzle s'assemblent et le phénotype *superkiller* est élucidé : loin de n'être qu'un processus antiviral, les gènes altérés chez la levure codent pour des protéines faisant partie de l'exosome (*SKI4* et *SKI6*) ou pour certains de ses co-facteurs (*SKI2*, *SKI3*, et *SKI8* pour le complexe SKI, *SKI7*). Ces protéines sont impliquées dans les voies de dégradation des ARNm en 3'-5'.

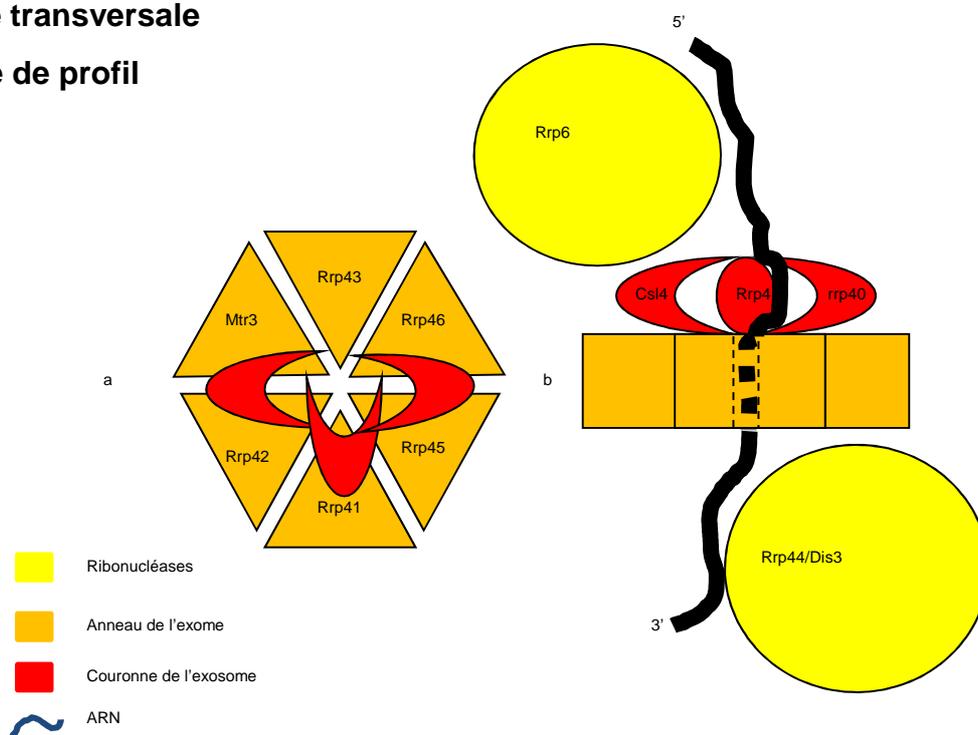
L'exosome cytoplasmique

Les 3 domaines de la vie (Bactéries, Archées et Eucaryotes) possèdent une structure composée d'un complexe hexamérique participant à la dégradation des ARN. Chez les eucaryotes et les archées, cette structure est dénommée l'exosome (Anderson et Parker, 1998, Buttner et coll. 2005, Liu et coll. 2006). Cette structure en anneau qui forme un canal central est composée de 6 protéines sur lesquelles se rajoute une couronne formée de 3 protéines ayant des domaines de fixation à l'ARN (Tableau 5 et Figure 4). Cette couronne est nécessaire à la stabilisation de l'exosome (Liu et coll. 2006). A la différence des archées qui ne possèdent que 2 types de protéines pour former l'anneau et de 2 pour la couronne, les eucaryotes possèdent 6 protéines différentes pour l'anneau et 3 protéines différentes pour la

Figure 4 : Schéma de l'exosome chez *Saccharomyces cerevisiae*

a) Vue transversale

b) Vue de profil



D'après Lykke-Andersen et coll. 2011 et Leporé et Lafontaine 2010

Tableau 5 : Protéines et gènes de l'exosome chez l'homme, *Saccharomyces cerevisiae* et les archées

	Levure (<i>S. cerevisiae</i>)	Archées	Domaines fonctionnels	Protéines Homme	Gènes Homme	Nombre d'AA (Homme)
Couronne	Csl4p/Ski4p	Csl4	S1 RBD	hCsl4	EXOSC1	195
	Rrp4p	Rrp4	S1/KH RBD	hRrp4	EXOSC2	293
	Rrp40p		S1/KH RBD	hRrp40	EXOSC3	275
Anneau Hexamérique	Rrp41p/Ski6p	Rrp41	RNase PH	hRrp41	EXOSC4	245
	Rrp46p		RNase PH	hRrp46	EXOSC5	235
	Mtr3p		RNase PH	hMtr3	EXOSC6	272
	Rrp42p	Rrp42	RNase PH	hRrp42	EXOSC7	291
	Rrp43p		RNase PH	OIP2	EXOSC8	276
	Rrp45p		RNase PH	PM/Scl-75	EXOSC9	456
	Rrp6p	n/a	RNase D	PM/Scl-100	EXOSC10	885
	Rrp44p/Dis3p	n/a	RNase R	Dis3 Dis3L1	DIS3 DIS3L1	958/1054

couronne (Januszyk et Lima 2010). Les structures diffèrent également par le fait que l'exosome ne possède pas de fonction de ribonucléase chez les eucaryotes, cette activité d'exonucléase et d'endonucléase étant assurée par deux autres protéines associées à l'exosome : Rrp6 et Rrp44/Dis3. (Dziembowski et coll. 2007, Lykke-Andersen et coll. 2009, 2011, Januszyk et Lima 2010). Rrp6 et Rrp44/Dis3 agissent sur des substrats communs mais ont aussi une activité spécifique (Gudipati et coll. 2012). Enfin, l'exosome (anneau+couronne) module l'activité des ribonucléases et est nécessaire à leur bon fonctionnement. Cette modulation s'exerçant au niveau du passage du brin d'ARN dans le canal central (Wasmuth et Lima 2012). Il existe des différences d'organisation chez les mammifères : Rrp6 a une double localisation nucléaire et cytoplasmique, (Chlebowski et coll. 2001) alors que *Rrp44/Dis3* existe sous la forme de 3 paralogues : DIS3, DIS3L et DIS3L2. DIS3 est de localisation nucléaire et possède une activité d'endo et d'exonucléase. DIS3L et DIS3L2 sont de localisation cytoplasmique et ne possèdent qu'une activité d'exonucléase (Tomecki, et coll. 2010). Une autre différence est que DIS3L2 ne s'associe pas à l'exosome contrairement à DIS3 et DIS3L (Astuti et coll. 2012). L'exosome est donc ubiquitaire dans la cellule, étant localisé à la fois dans le noyau, le nucléole et le cytoplasme. Par contre, ses cofacteurs ont des localisations spécifiques. L'exosome cytoplasmique requiert chez la levure 2 cofacteurs : Ski7 et le complexe SKI composé de Ski2, 3 et 8 (Schaeffer et coll. 2010).

Fonctions de l'exosome cytoplasmique

A l'inverse de l'exosome nucléaire qui a pour substrats des ARN variés l'exosome cytoplasmique exerce son action essentiellement sur des ARNm (Gudipati et coll. 2012). Ces substrats sont les ARNm normaux, les ARNm aberrants comme

les ARN sans stop ou sans initiation, les produits de dégradation des endoribonucléases et certains ARN viraux.

ARNm

La dégradation des ARNm joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique des organismes. Il existe deux voies de dégradation : l'une s'exerçant en 5'-3' et médiée par Xrn1, l'autre en 3'-5' et assurée par l'exosome. Cette dégradation a lieu après élimination de la queue polyA dans les deux cas. La voie 5'-3' semble prépondérante et présente une vitesse de dégradation 2.5 fois plus rapide (Decker et Parker 1993, Schaeffer et coll. 2010). Dans le cas de la voie 3'-5', cette dégradation est essentiellement due à l'activité exonucléasique de l'exosome (Schneider et coll. 2009) mais, dans certains cas, la destruction des ARNm peut être initiée par une cassure préalable par une endoribonucléase agissant en amont de l'exosome comme Smg6, Dom34-Hbs1 ou DICER.

ARNm aberrants

Il s'agit de la fonction principale de l'exosome cytoplasmique. La dégradation de ces ARNm aberrants doit être rapide afin d'empêcher les effets délétères de ces ARNm. Les mécanismes de dégradation varient en fonction de l'anomalie portée par l'ARNm :

ARNm sans codon stop : il s'agit de la voie la mieux connue. Dans le modèle actuel, en l'absence de codon stop, l'ARNm est traduit jusqu'à la fin de la queue polyA où le ribosome est bloqué. Ski7 est alors recrutée par son extrémité C-terminale dans le ribosome, puis le complexe SKI et l'exosome sont recrutés permettant la dégradation de l'ARNm (Klauer et Van Hoof 2012). Des protéines anormales peuvent toutefois

être traduites notamment en cas d'atteinte concomitante du complexe SKI et de l'endonucléase composée par le complexe Dom34/Hbs1 (Tsuboi et coll. 2012).

Dégradation des ARNm avec codon stop prématuré (Exoribonucléase) : dans ce cas, la voie 5'-3' est prépondérante, la voie en 3'-5' de l'exosome n'étant qu'une voie accessoire (Muhlrad et Parker 1994). La dégradation en 5'3' est initiée par les Upf (up-frameshiftproteins) puis après destruction de la coiffe, il y a dégradation par Xrn1 (Hu et coll. 2010).

Dégradation des ARNm avec codon stop prématuré (Endoribonucléase) : chez l'homme et la drosophile, les ARNm avec codon stop prématuré peuvent aussi être dégradés après initiation par une cassure par SMG6. Ce dernier fragmente l'ARNm en deux brins secondairement détruits par l'exosome (en 3'-5'). Cette opération nécessitent le complexe SKI ou Xrn1 (en 5'-3') (Huntzinger et coll. 2008, Eberle et coll. 2009).

Dégradation des ARNm présentant des pauses traductionnelles : dans ce cas, la traduction est empêchée par l'existence d'une structure secondaire de l'ARNm, (tige-boucle, pseudo-nœud). Ce dernier est alors clivé en deux fragments (majoritairement par Dom34 et Hbs1) et les 2 fragments sont secondairement dégradés par l'exosome (Doma et Parker 2006, Shoemaker et coll. 2010).

Dégradation des ARNm issu de l'ARN interférence : Les produits des ARNm générés par le complexe RISC lors de l'interférence à ARN sont secondairement dégradés par XRN1 et par l'exosome (Orban et coll. 2005).

ARN viraux

Cette fonction est surtout connue chez la levure. En effet, c'est le phénotype de majoration de la production de toxine virale qui a permis l'identification des protéines de l'exosome et du complexe SKI. Le complexe SKI et l'exosome

dégradent les ARN viraux dépourvus de queue polyA et de coiffe. Certains virus ont développé des stratégies de résistance en intégrant des structures complexes en 3' destinées probablement à bloquer l'exosome (Moon et coll. 2012). Les virus à ARN sont nombreux ; pour mémoire chez l'Homme, parmi les virus à ARN impliqués en pathologie, figurent celui de la grippe, de la rougeole, de la rubéole, des oreillons, des hépatites A et E, et le rotavirus.

Maladies liées à une altération de l'exosome chez l'homme

Maladies acquises

Exosome et auto-immunité

Les connectivites ou collagénoses sont des maladies du tissu conjonctif. Ce groupe de pathologies comprend

- la sclérodermie : micro-angiopathie diffuse avec des atteintes rénales, pulmonaires ou cardiaques (Allanore et coll. 2008),
- la polymyosite : myopathie inflammatoire proximale (Dalakas et Hohlfeld 2003),
- et la dermatomyosite : maladie inflammatoire touchant à la fois les muscles et la peau (Callen 2000).

Des anticorps dirigés contre RRP45 et RRP6 servent de marqueurs depuis les années 70, pour le diagnostic de connectivites (Wolfe et coll. 1977). Ces anticorps ont été dénommés anti-PM/Scl par Reichlin et coll. en 1984 (pour polymyositis/scleroderma) car ils sont spécifiques du syndrome de chevauchement entre la polymyosite et la sclérodermie (un syndrome de chevauchement est un syndrome associant les caractéristiques cliniques de deux maladies).

On a pu mettre en évidence que les anticorps anti-PM/Scl étaient principalement spécifiques de deux protéines de 75 kDA et 100 kDA respectivement (Alderuccio et coll. 1991 et Bluthner et coll. 1992) et que ces protéines étaient associées en complexe avec 11 autres protéines (Reimer et coll. 1986). Ce n'est qu'en 1999, avec la découverte de l'exosome de levure, que le complexe PM/Scl a été rapproché de l'exosome humain (Allmang et coll. 1999). Des auto-anticorps peuvent être dirigés vers différents composants de l'exosome mais les 3 principaux sont RRP45 (PM/Scl75), RRP6 (PM/scl100) et RRP44 (Staals et Pruijn 2010). Ces anticorps semblent n'être que des marqueurs sans être directement impliqués dans la physiopathologie de la maladie.

Exosome et cancer

Bien que le lien entre régulation des ARNm et cancer soit fortement suspecté, peu de données sont disponibles. Outre le syndrome de Perlman (voir chapitre suivant), on peut noter que Fang et coll. en 2004, ont montré que le 5-Fluoro-Uracile (agent anticancéreux de la classe des antimétabolites) agit sur l'exosome en inhibant RRP6 (Zhao et Xu, 2007). Par ailleurs, des anticorps anti RRP6 ont été retrouvés chez les patients présentant une leucémie chronique, cette réactivité semblant être corrélée avec une fréquence plus élevée de rejet tumoral (Yang et coll. 2002).

Maladies constitutionnelles

Exosome et études d'association pangénomique

Un variant intronique de SKIV2L (rs429608) a été retrouvé comme étant un facteur de protection de la dégénérescence maculaire liée à l'âge dans une étude

d'association (Koplin et coll. 2011) mais aucun lien n'a été établi entre cette pathologie et la fonction de SKIV2L.

Exosome et maladies constitutionnelles

En 2012, Wan et coll. ont mis en évidence que des mutations de *EXOSC3*, gène codant pour EXOSC3/RRP40, étaient responsables d'une hypoplasie ponto-cérébelleuse et d'une dégénérescence des motoneurones spinaux.

En 2012 également, Astuti et coll. ont décrit des mutations de *DIS3L2* chez des patients atteints de syndrome de Perlman qui associe une macrosomie et des tumeurs de Wilms. On peut remarquer que *DIS3L2* est un des 3 paralogues de *DIS3* de la levure. Son association à l'exosome est encore équivoque et sa fonction exacte inconnue en dehors de son activité d'exoribonucléase.

Si on ajoute le syndrome DS/THE, à ces 2 entités cliniques, ce sont donc 3 maladies très différentes qui ont été rapportées à des anomalies de l'exosome en 2012, évoquant un rôle spécifique de chacune des protéines impliquées.

Le Complexe SKI chez la levure et chez l'homme

Constitution

Le complexe SKI de la levure est un hétéro-tétramère constitué de 2 molécules de Ski8, 1 molécules de Ski2 et 1 de Ski3 (Synowsky et Heck 2008). A partir d'une approche double hybride, il a pu être établi que la partie N-terminale de Ski2 interagit directement avec la partie C-terminale de Ski3 et avec Ski8 (interactions faibles), tandis que Ski8 interagit avec la partie C-terminale de Ski3 par des interactions fortes (Wang et coll. 2005). L'analyse en spectrométrie de masse du complexe SKI a permis de déterminer que les 2 unités Ski8 ont une interaction directe entre elles, ainsi que Ski2 et Ski3, et que Ski8 et Ski2. Une interaction directe entre Ski2 et Ski8 est suggérée par les modèles double hybride alors qu'elle semble médiée par Ski3 lors de l'analyse en spectrométrie de masse (Figure 5). Il existe des orthologues des gènes du complexe SKI chez quasiment tous les eucaryotes (Tableau 6).

Localisation

Le complexe SKI de la levure est de localisation cytoplasmique (Brown et coll. 2000). On pourrait s'attendre à ce qu'il en soit de même chez les autres espèces. Chez l'Homme, seules 2 études rapportent des localisations : l'une semble indiquer qu'une partie du complexe SKI est localisé dans les noyaux (Zhu et coll. 2005), alors que l'autre montre que SKIV2L (orthologue de Ski2) serait localisée uniquement dans le cytoplasme et le nucléole (Qu et coll.1998).

Figure 5 : Schéma du complexe SKI chez *Saccharomyces cerevisiae* (a) schéma général, (b) zone d'interaction de SKI2 et SKI3 avec les autres membres du complexe SKI

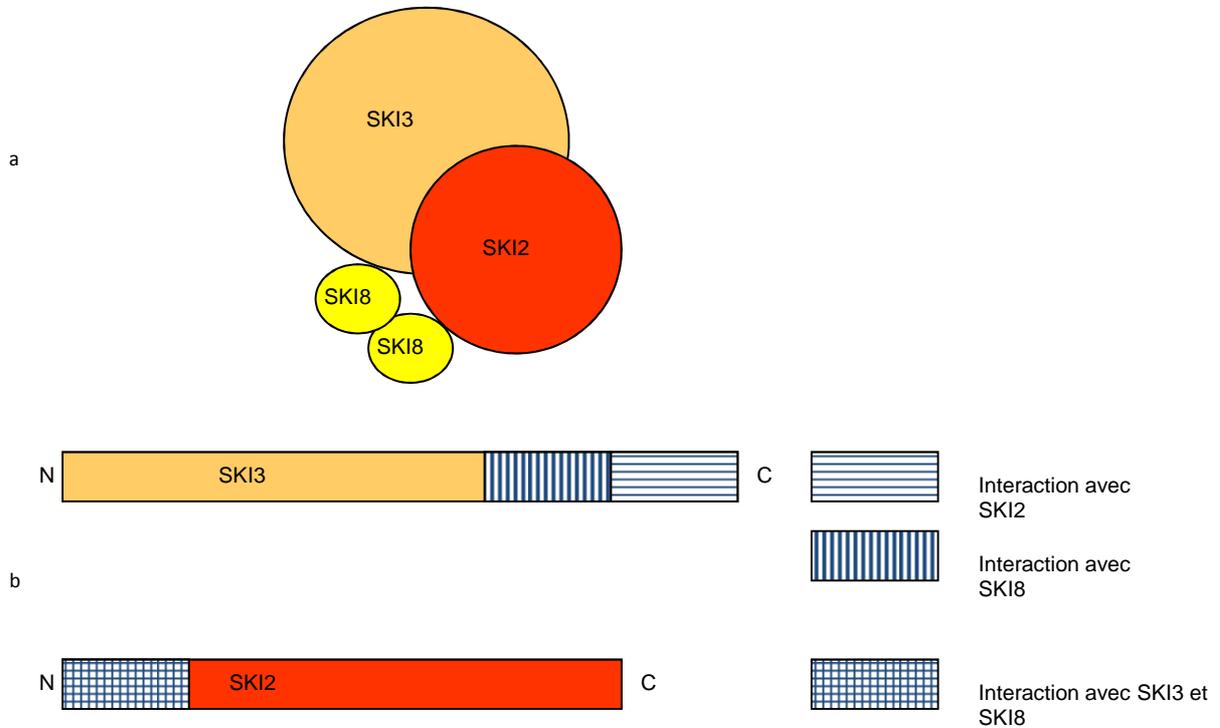


Tableau 6 : Orthologues des gènes de la levure (SKI2, SKI3, SKI8) chez Arabidopsis, la Drosophile et l'Homme

SKI2	Arabidopsis	Levure	Drosophile	Homme
Nom gène	At3g46960	SKI2	Twister	SKIV2L
Nom protéine	Antiviral helicase SKI2	Antiviral helicase SKI2	helicase Ski2	Helicase SKI2W
Nombre d'AA	1347	1287	1197	1246

SKI3	Arabidopsis	Levure	Drosophile	Homme
Nom gène	Superkiller protein 3-like protein	SKI3	CG8777	TTC37
Nom protéine	At1g76630	YPR189W	CG8777	Tetratricopeptide repeat protein 37
Nombre d'AA	1168	1432	1233	1564

SKI8	Arabidopsis	Levure	Drosophile	Homme
Nom gène	F27B13.70	SKI8	CG3909	WDR61
Nom protéine	At4g29830	Antiviral protein SKI8	CG3909	WD repeat-containing protein 61
Nombre d'AA	321	397	331	305

Composants du complexe SKI

Ski2/SKIV2L

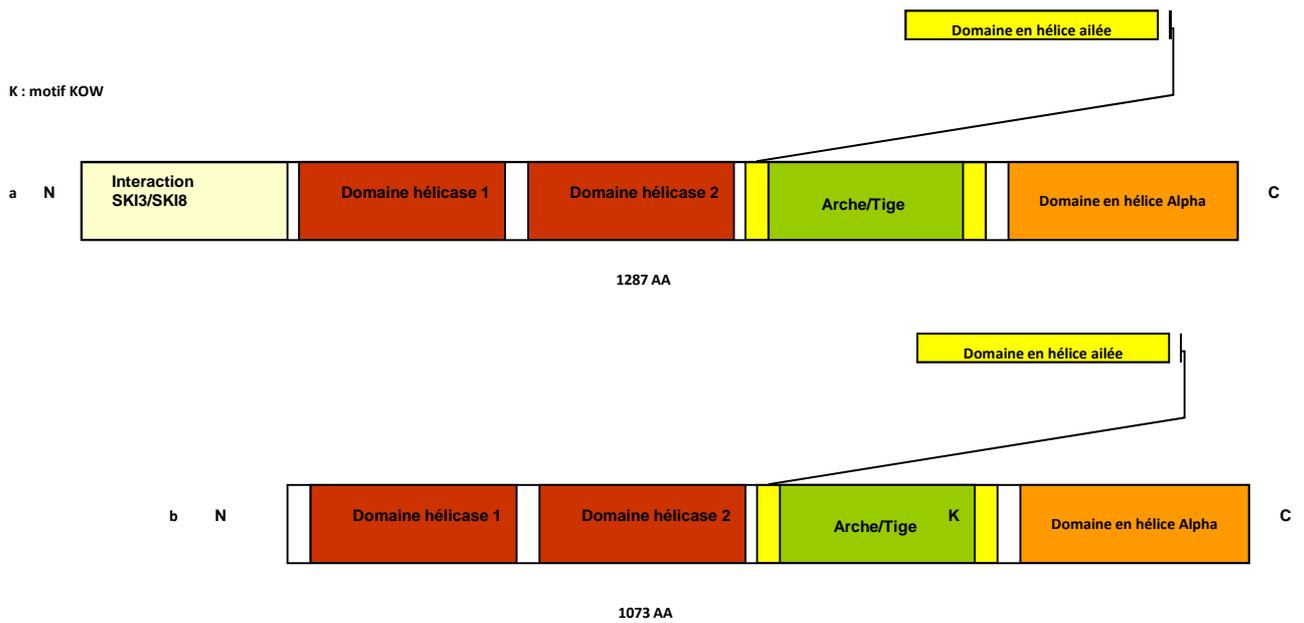
Caractéristiques

La protéine Ski2 est le produit de la traduction du gène *SKI2* chez la Levure et *SKIV2L* chez l'Homme. Il s'agit d'une hélicase à ARN appartenant à la famille des hélicases de type SKI2 et à la superfamille des hélicase de type 2 (SF2) (Fairman-Williams ME, et coll. 2010, Johnson et Jackson 2012).

Structure

La structure de Ski2 a été décrite en détail en 2012, par Halbach et coll. Elle est composée de deux parties : l'extrémité 5' permettant l'interaction avec Ski3 et Ski8, et le reste composant la partie hélicase proprement dite. Ski2 présente les 4 domaines des hélicases de type SKI2 soit deux domaines RecA, un domaine à hélice ailée et un domaine C-terminal en hélice alpha. Par ailleurs, on note au milieu du domaine à hélices ailées, un domaine spécifique aux hélicases de l'exosome : l'arche à ARN (ou tige). (Jackson et coll. 2010, Halbach et coll. 2012). Si on compare la structure de Ski2 à celle de Mtr4, l'autre hélicase cofacteur de l'exosome nucléaire, on retrouve dans les 2 cas une structure d'hélicases à ARN appartenant à la famille des hélicases DExH et plus particulièrement à celle des SKI2-Like. Il s'agit de deux cofacteurs de l'exosome, l'un étant nucléaire (Mtr4) et l'autre cytoplasmique (Ski2). En plus de leur ressemblance avec les autres hélicases SKI2 Like, elles partagent un domaine particulier, l'arche à ARN, qui, bien que légèrement différente, est spécifique de leur fonction (Jackson et coll. 2010, Halbach et coll. 2012) . Les 320 premiers AA de Ski2 ne sont pas communs à Ski2 et Mtr4, ils correspondent aux zones d'interaction avec Ski3 et Ski8 (Wang et al. 2005) (Figure 6).

Figure 6 : Schéma de la structure de Ski2 (a) et de Mtr4 (b) (chez *Saccharomyces cerevisiae*) d'après Jackson et coll. 2010 et Halbach et coll. 2012 (4 domaines caractéristiques des hélicases de type SKI2 domaines, hélicase 1, domaine hélicase 2, domaine en hélice ailée, domaine en hélice alpha, et domaine spécifique de SKI2 arche à ARN)



Localisation

La localisation est cytoplasmique chez la levure (Huh, et coll. 2003, <http://yeastgfp.yeastgenome.org/getOrf.php?orf=YLR398C>) et cytoplasmique et nucléolaire chez l'homme (Qu et al.1998).

Mutants

Les mutants de Ski2 présentent le phénotype *superkiller*, une accumulation globale d'ARNm, une résistance diminuée au jeûne et au froid et une diminution des capacités de croissance lorsqu'ils sont en compétition avec les souches sauvages. Le mutant de l'orthologue de *SKI2* chez *Arabidopsis* présente essentiellement un nanisme avec une croissance ralentie (Dorcey et coll. 2012).

Il existe des modèles déficitaires en Mtr4/SKIV2L2. Les *Arabidopsis Thaliana* déficitaires en MTR4 sont viables mais présentent des défauts de développement notamment au niveau de feuille (Lange et coll. 2011). Chez le poisson Zèbre, les mutants de *skiv2l2*, présentent, aux stades larvaires, des anomalies de croissance, et ne sont pas viables (Yang et coll. 2007).

Ski3/TTC37

Structure

Il s'agit de la plus grande protéine du complexe SKI. Ski3 et tous ses orthologues codent pour des protéines composées de motifs TPR (Rhee et coll. 1989). Les TPR sont des motifs dégénérés de 34 acides aminés qui seraient impliqués dans les interactions protéine-protéine (uniprot, Alan et coll. 2011). Le motif est globalement basé sur le consensus W-L-G-Y-A-F-A-P (Lamb et coll, 1995). La structure tridimensionnelle est celle de 2 hélices alpha antiparallèles (D'andrea et Regan, 2003).

Localisation

La localisation est cytoplasmique chez la Levure (Huh, et coll. 2003, <http://yeastgfp.yeastgenome.org/getOrf.php?orf=YLR398C>). Chez l'Homme, elle semble essentiellement cytoplasmique, même si Zhu et coll. décrivent une localisation partiellement nucléaire. Le site web HumanProtein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>), comporte des données contradictoires, les données d'immunohistochimie décrivent une localisation cytoplasmique en granule, alors qu'en d'immunofluorescence la localisation est essentiellement nucléaire, mais non nucléolaire.

Mutants

Les mutants de Ski3 présentent le phénotype *superkiller*, une accumulation d'ARNm, une résistance diminuée au froid et une diminution des capacités de croissance lorsqu'ils sont en compétition avec les souches sauvages.

Ski8/WDR61

Caractéristiques

Ski8 est une protéine qui a un double rôle d'une part, il s'agit d'un composant du complexe SKI, d'autre part, elle est impliquée dans la méiose (Arora et coll. 2004). Chez l'Homme et Arabidopsis, elle est associée au complexe PAF (Zhu et coll. 2005, Dorcey et coll. 2012).

Structure

Ski8 est une protéine de la famille des protéines à répétitions WD40. Ce domaine, présent dans de nombreuses protéines, est composé d'un motif défini par un cœur de 40 acides aminés, débutant par une glycine-histidine et se terminant par un tryptophane-acide aspartique (Xu et al. 2011).

Fonction

Outre son rôle dans le complexe SKI, Ski8 agit au cours de la méiose en s'associant avec Spo11 et en initiant la cassure double brin nécessaire aux recombinaisons (Arora 2004). Alors que les orthologues humains et d'*Arabidopsis* participent également au complexe PAF (Zhu et coll. 2005, Dorcey et coll. 2012), le rôle de Ski8 dans la méiose ne semble pas être conservé chez les orthologues humains (Kumar et DeMassy 2010, Jolivet et coll. 2006).

Localisation

Du fait de ces deux fonctions, la localisation est cytoplasmique et nucléaire durant la méiose chez la levure (Hu et coll. 2003, Yeastgenome). Chez l'Homme et *Arabidopsis* elle semble également cytoplasmique et nucléaire (Zhu et coll. 1995 The HumanProtein Atlas, Dorcey et coll. 2012).

Mutants

Si une partie du phénotype des levures ayant perdu la fonction de Ski8 est identique à celle des mutants pour Ski2 et Ski3, à savoir un phénotype *superkiller*, il existe également un phénotype ayant trait aux fonctions méiotiques avec une diminution, voire une absence de la sporulation et une diminution des recombinaisons lors de la méiose.

Chez *Arabidopsis*, l'absence de *VIP3* (l'orthologue de *SKI8*) est responsable d'un phénotype *ZWARGERL* (mot bavarois signifiant nain) qui présente un nanisme avec un bourgeonnement précoce et aberrant. L'étude des ARNm, par des techniques d'ARNseq, montre une accumulation de fragments 3' d'ARNm par rapport aux fragments 5'. Le phénotype est sauvé par un apport de Ski8, l'orthologue de la levure mais pas par *wdr61*, l'orthologue murin (Dorcey et al. 2012).

Ski7

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le recrutement de l'exosome pour la dégradation des ARNm sans stop se fait par l'intermédiaire de Ski7. Cependant, Ski7 est seulement retrouvé chez *Saccharomyces cerevisiae*. Chez les Mammifères, on pense que HBS1L pourrait assurer les fonctions de Ski7, étant l'orthologue de Hbs1, qui lui-même, est un paralogue de Ski7 chez la levure. En effet, la protéine Hbs1 de *S. Kluyveri* est capable de compléter les deux fonctions, faisant penser que les orthologues d'Hbs1 accomplissent ces deux fonctions chez les autres eucaryotes (Van Hoof 2005).

Conclusion

Le complexe SKI est un hétéro-tétramère composé d'une hélicase (Ski2), d'une protéine à domaine TPR (Ski3) et de deux unités d'une protéine à domaine WDR (Ski8). Il s'agit d'un cofacteur de localisation cytoplasmique nécessaire à l'activité de l'exosome cytoplasmique. Le tableau 7 résume les phénotypes des organismes ayant une mutation dans un des composants du complexe SKI.

Tableau 7 : Phénotypes observés lors des altérations du complexe SKI chez :

a) *Saccharomyces cerevisiae*, b) *Arabidopsis thaliana*, c) *Homo sapiens*

a)

Mutation dans	<i>SKI2</i>	<i>SKI3</i>	<i>SKI8</i>	<i>SKI7</i>
Phénotype	<ul style="list-style-type: none"> Accumulation des ARNm Accumulation des fragments d'ARNm Sensibilité au froid accrue Augmentation de la transposition des éléments transposables Diminution de la résistance au jeûne 	<ul style="list-style-type: none"> Accumulation des ARNm Accumulation des fragments d'ARNm Sensibilité au froid accrue 	<ul style="list-style-type: none"> Accumulation des ARNm Accumulation des fragments d'ARNm Sensibilité au froid accrue Diminution de la recombinaison meiotique Absence ou diminution de la sporulation Diminution de la transposition des éléments transposable Diminution de la croissance végétative Sensibilité à la chaleur accrue 	<ul style="list-style-type: none"> Accumulation des ARNm Sensibilité au froid accrue
Capacité de croissance en compétition avec les souches sauvages	<ul style="list-style-type: none"> Diminuée 	<ul style="list-style-type: none"> Diminuée 	<ul style="list-style-type: none"> Diminuée 	<ul style="list-style-type: none"> Diminuée
Résistance aux antifongiques vis à vis des souches sauvages	<ul style="list-style-type: none"> Bleomycin Camptothecin Fluconazole Cordycepin Hydroxyurea 	<ul style="list-style-type: none"> Cisplatine Cordycepin 	<ul style="list-style-type: none"> Camptothecin Fenpropimorph 	<ul style="list-style-type: none"> L-canavanine
Résistance aux antifongiques diminués vis à vis des souches sauvages	<ul style="list-style-type: none"> Cycloheximide Glycolaldehyde Hygromycin B Streptomycin 	<ul style="list-style-type: none"> 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Amitrole Cycloheximide Extrait de St John Wort 	<ul style="list-style-type: none"> Acetaldehyde Bleomycin Cycloheximide ionic stress resistance methyl methanesulfonate Propolis extract 	<ul style="list-style-type: none"> Cycloheximide Hygromycin B PentaChlorophenol Streptomycin

Source : Yeast genome

b)

Mutation dans	<i>SKI2</i>	<i>VIP3(SKI8)</i>
Phénotype	<ul style="list-style-type: none"> Nanisme 	<ul style="list-style-type: none"> Accumulation des ARNm Nanisme Fleurissement précoce Anomalie du fleurissement

Source : Dorcey et al. 2012

c)

Mutation dans	<i>TTC37/SKIV2L</i>
Éléments constants	<ul style="list-style-type: none"> Diarrhée grave rebelle Dysmorphie Anomalies de cheveux
Éléments fréquents	<ul style="list-style-type: none"> RCIU Anomalies immunitaires
Éléments inconstant	<ul style="list-style-type: none"> Atteinte hépatique Atteinte cutanée
Éléments rare	<ul style="list-style-type: none"> Anomalies cardiaques congénitales Anomalies des plaquettes

Seconde Partie

Caractérisation des bases moléculaires du syndrome DS/THE

Constitution d'une collection d'ADN et de cellules de patients atteints de syndrome DS/THE

Une majorité des cas de DS/THE sont décrits au sein d'équipes françaises, témoignant d'un intérêt particulier pour cette pathologie. En France, une cohorte de patients suivis dans les hôpitaux parisiens de Robert Debré et de Necker-enfants malades, a été décrite en 2004 par le Dr Martinez-Vinson dans le cadre de sa thèse d'exercice. A cette cohorte parisienne, se sont ajoutés deux patients suivis à Marseille et à Toulouse (Fabre et coll. 2007).

Dans le cadre d'une collaboration nationale, nous avons pu constituer initialement une collection d'échantillons biologiques de ces 8 patients français, issus de 7 familles.

Nous avons recueilli les consentements et les prélèvements pour les patients eux-mêmes et pour certains membres de leur famille, soient au total 37 prélèvements rassemblant 8 sujets atteints et 29 apparentés. Les prélèvements ont été faits à la suite d'une consultation médicale et un consentement écrit à l'utilisation des prélèvements à des fins de Recherche, a été recueilli. Les prélèvements ont été déposés au Centre de Ressource Biologique Timone (cellules et ADN). Depuis les premiers dépôts, cette collection n'a cessé de croître. Elle compte aujourd'hui des échantillons pour 37 patients et 80 de leurs apparentés en provenance de plus de 10 pays différents.

Les sujets atteints présentaient un syndrome DS/THE typique et étaient suivis dans des unités de gastro-entérologie pédiatrique. Le tableau 8 récapitule les

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des 8 premiers patients inclus dans la collection DS/THE

Identifiant famille	NAI	ORN	ORN	GRY	GRD	ZET	FRA	COU
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Sexe	M	F	M	M	M	F	F	F
Terme	40	38	38	38	34	33+4	39	40
RCIU	Oui (<<5eme P)	Non	Non	Oui (<5eme P)	Non	Oui (<<5eme P)	Oui (<5eme P)	Oui (<5eme P)
Diarrhée grave rebelle	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Age de début (Semaine)	1	3	11	3	5	4	1	4
Anomalies des cheveux	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Présence de Trichorhexis nodosa	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Dysmorphie faciale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Anomalies immunitaires	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Atteinte hépatique	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non
Atteinte cutanée	Oui	Oui	Oui	Non	nd	Oui	Oui	nd

caractéristiques cliniques des 8 patients et le tableau 9, les données concernant les familles. Les arbres généalogiques de ces familles sont présentés dans la figure 7.

Un travail préliminaire a consisté à tester 7 gènes sélectionnés sur la base d'une approche gènes candidats (*EGFR*, *HRAS*, *DSP*, *JUP*, *CTNNB1*, *PLEC1*, et *EPPK1*) (Fabre et coll. 2009). Les gènes ont été sélectionnés en raison de leur implication dans des phénotypes chevauchants avec les DS/THE soit dans des modèles animaux (Miettinen et coll. 1995) soit chez l'Homme. Tous les gènes testés ont été exclus.

Caractérisation des bases génétiques des DS/THE

Compte tenu de la distribution des cas dans les familles évoquant une transmission autosomique récessive et du fait que nous avons pu collecter des échantillons pour les patients et leur famille, nous avons réalisé une étude de liaison pangénomique afin de caractériser des régions du génome potentiellement liées à la maladie.

L'analyse de liaison a été réalisée en collaboration avec le centre national de génotypage (CNG), à Evry sur puces SNP Affimetrix GeneChip Mapping 250K Nspl. L'analyse des résultats a été réalisée sur GeneSpring GT (VARIA) d'Agilent.

Recherche d'une région d'homozygotie

L'analyse de liaison dans les 7 familles n'a pas permis de mettre en évidence de locus ayant un Lod score significatif. Ceci qui peut s'expliquer soit par la possibilité de l'implication de plusieurs gènes dans le syndrome soit par un manque d'informativité de nos familles.

Une analyse par recherche de région d' homozygotie a été alors réalisée. Cette stratégie, qui recherche les régions homozygotes partagées par les individus atteints

Figure 7 : Arbres généalogiques des 7 familles initialement incluses dans la collection de prélèvements biologiques

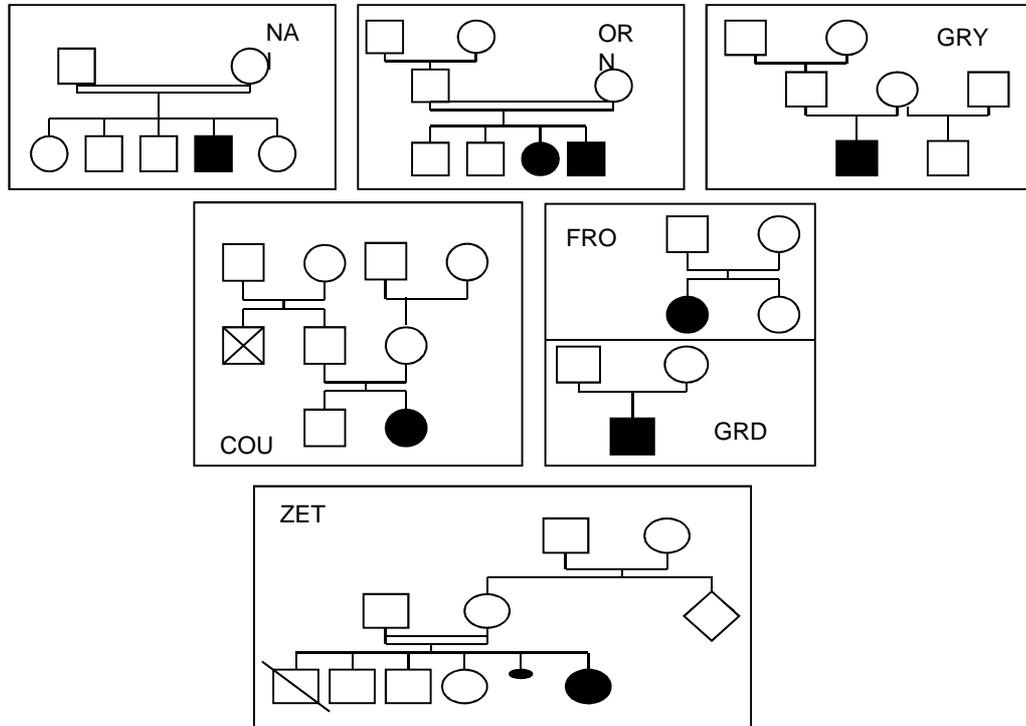


Tableau 9 : Cohorte Française Initiale

Nom	Origine	Origine géographique	Nombre de prélèvements				Consanguinité
			Sujets atteints	Parents	Fratrie	Grands-parents	
NAI	Marseille	Maghreb	1	2	4	0	Oui
GRD	Toulouse	France	1	1	0	0	Non
OR	Paris	Proche Orient	2	2	2	1	Oui
ZET	Paris	Maghreb	1	2	3	1	Oui
GRY	Paris	France	1	2	0	1	Non
COU	Paris	France	1	2	1	2	Non
FRA	Paris	France	1	2	1	0	Non

Sujets atteints	Parents	Fratrie	Grands-parents	Total
8	13	11	5	37

et absentes chez les apparentés sains, a pu être appliquée pour l'analyse des résultats des 3 familles issues de mariage consanguin (familles NAI, ORN, ZEI). Les régions avec une valeur de Lod score supérieure à 5 sont présentées dans le tableau 10 et la figure 8. Aucune région n'était commune aux 3 familles mais une région de 5,5M située en 5q14-5q15 était commune à deux familles (NAI et ORN). Cette région contenait 35 gènes d'après la séquence de référence NCBI 36, lors de l'analyse en 2008 (Tableau 11).

Concernant la troisième famille (ZEI), une région du chromosome 6 présentait un Lod Score nettement plus élevé que les autres régions potentiellement incriminées (Lod Score = 95.21). Cette région du chromosome 6 de 31.15 Mb, située en 6p, contenait quant à elle, 856 gènes.

A l'issue de l'analyse de liaison pangénomique, nous avons donc identifié deux régions candidates pour les DS/THE : l'une de 5 Mb en 5q et l'autre de 31Mb en 6p. Nous avons également mis en évidence une potentielle hétérogénéité génétique du syndrome.

Exploration de la région en 5q et implication de *TTC37*

Sur les 35 gènes localisés dans la région, 15 étaient putatifs et 20 codaient pour des protéines connues. Aucun de ces gènes n'étant un candidat sur la base de sa fonction, nous avons opté pour un séquençage systématique des 35 gènes (régions exoniques et introniques flanquantes). Ainsi les gènes *ELL2*, *GLRX*, *GPR150*, *RHOTB3*, *TUBG5* ont été séquencés sans que des variations de séquence pathogènes soient retrouvées.

Dans le même temps, une autre équipe travaillant sur la problématique des syndromes DS/THE a incriminé le gène *TTC37* comme responsable de cette

Tableau 10 : Recherche de régions homozygotes dans les familles NAI, ORN et ZET : régions avec un Lod Score >5 (en gras, les régions ayant un score maximal)

Chr.	NAI		ORN		ZET	
	Localisation	Lod	Localisation	Lod	Localisation	Lod
1	[81949344:163685844]	114,3			[54856121:59720536]	14,46
2	[164038528:202224498]	89,58			[157735225:160168582]	7,577
3	[191807982:193830399]	7,766	[57219937:58599810]	5,582		
4			171026541:172337695]	6,72	[42287007:55649346] 4[109388086:117961595]	6,256 6,499
5	[35394310:141547599]	249,9	[90425206:95503345] [151876702:152739206]	19,9 7,129		
6	[74058141:110159969] [145151300:147412758]	46,5 5,501			[9372877:40526934]	95,21
7	[31559338:34237574] [67876981:74938926]	10,73 7,609			[83434171:84821977]	5,023
8	[38279200:40180475]	5,245	[51082766:52192291]	6,497		
9					[21225216:71510582] [105872984:129769338]	65,1 24,64
10			[868895:1458978]	7,181	[72295747:81776666]	15,37
11	[47581290:55723902]	10,16	[41699048:41994582] [124530135:125496508]	6,148 5,517		
12			[53761101:54048786] [83110470:83491621]	6,699 6,199	[56049787:57527670]	5,378
13			[40667660:41389984]	6,765		
14			[72832985:74653021]	6,012		
15			[90224667:91537949]	7,331		
19			[19800387:21470638]	8,178		

Figure 8 : Recherche de régions homozygotes pour les familles a) ORN, b) NAI et c) ZET

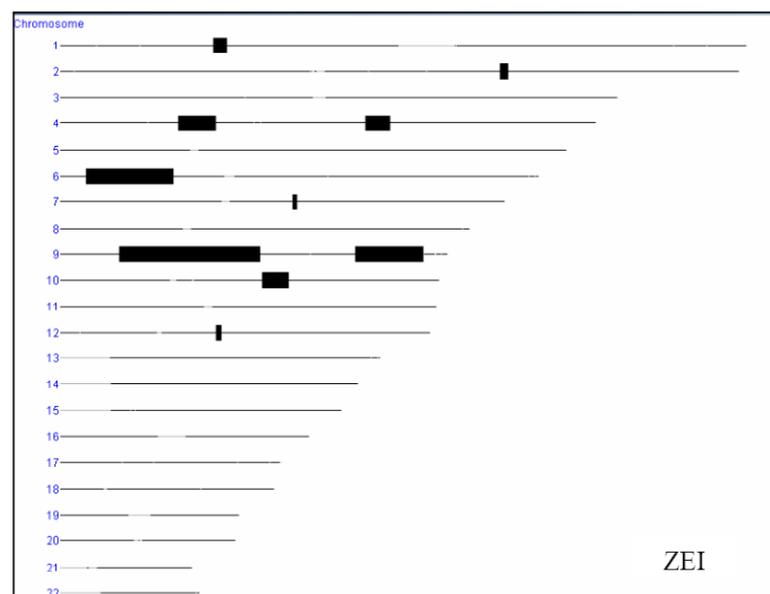
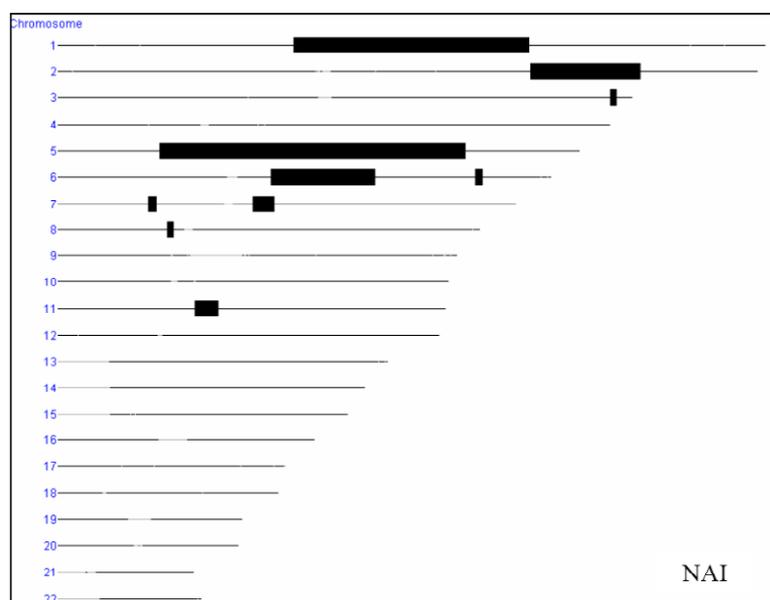
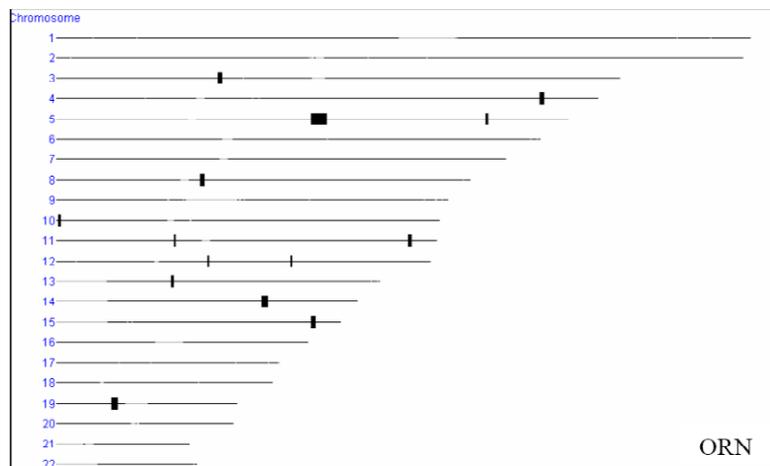


Tableau 11 : Gènes situés sur le chromosome 5 dans la région d'homozygotie 5q13-q15 (Extrait de NCBI)

start	Stop	Symbol	Cyto	Description
89890373	90495789	GPR98	5q13	G protein-coupled receptor 98
90611670	90612715	LOC729040	5q14.3	hypothetical protein LOC729040
90686052	90686510	LOC133790	5q14.3	similar to ribosomal protein S18
90700297	90714877	ARRDC3	5q14.3	arrestin domain containing 3
90711952	90770657	LOC100129716	5q14.3	hypothetical protein LOC100129716
90801432	90808638	LOC133789	5q14.3	similar to Ras-related protein Rab-5C (RAB5L) (L1880)
91175257	91207447	LOC100131236	5q14.3	hypothetical LOC100131236
92202248	92203112	LOC100129283	5q15	hypothetical LOC100129283
92251624	92330826	LOC391810	5q15	similar to T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta) (CCT-eta)
92628743	92630146	LOC391811	5q15	similar to DNA polymerase delta subunit 2 (DNA polymerase delta subunit p50)
92944799	92955544	NR2F1	5q14	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
92948903	92955406	LOC100129010	5q15	hypothetical protein LOC100129010
92956273	92978384	LOC100131073	5q15	hypothetical protein LOC100131073
92961925	92962326	LOC100131066	5q15	hypothetical protein LOC100131066
92979531	93436221	C5orf21	5q15	chromosome 5 open reading frame 21
93043958	93045275	LOC100133277	5q15	similar to nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
93101771	93103065	POU5F2	5q15	POU domain class 5, transcription factor 2
93224410	93225287	FLJ12078	5q15	hypothetical protein FLJ12078
93880919	93980040	C5orf36	5q15	chromosome 5 open reading frame 36
93943653	93955086	LOC100131573	5q15	hypothetical protein LOC100131573
94040330	94057338	ANKRD32	5q15	ankyrin repeat domain 32
94068957	94646035	MCTP1	5q15	multiple C2 domains, transmembrane 1
94752804	94811900	FAM81B	5q15	family with sequence similarity 81, member B
94825868	94916438	KIAA0372	5q15	KIAA0372
94916581	94966562	ARSK	5q15	arylsulfatase family, member K
94981736	94983040	GPR150	5q15	G protein-coupled receptor 150
95008340	95018600	RFESD	5q15	Rieske (Fe-S) domain containing
95019775	95044470	SPATA9	5q15	spermatogenesis associated 9
95092606	95157827	RHOBTB3	5q15	Rho-related BTB domain containing 3
95175431	95184137	GLRX	5q14	glutaredoxin (thioltransferase)
95195502	95196506	LOC727938	5q15	hypothetical protein LOC727938
95213695	95221593	C5orf27	5q15	chromosome 5 open reading frame 27
95246558	95323531	ELL2	5q15	elongation factor, RNA polymerase II, 2
95410406	95577074	LOC441097	5q15	hypothetical LOC441097
95440597	95440671	MIRN583	5q15	microRNA 583

pathologie (Hartley et coll, 2010). La stratégie suivie par cette équipe était identique à la nôtre avec constitution d'une cohorte de 12 patients dont 8 issus de mariages consanguins, génotypage sur puces SNP affymetrix 250 K, puis séquençage de la région d'intérêt (région de 12.9 Mb contenant 57 gènes). Ce n'est qu'après avoir séquencé 42 des gènes de la région que cette équipe a pu mettre en évidence des mutations pathogènes dans le gène *TTC37*. Neuf mutations (3 mutations stop, 3 mutations faux sens et 3 situées sur un site d'épissage) ont été caractérisées, avec une ségrégation intrafamiliale compatible avec une transmission récessive. Aucune de ces mutations n'a été retrouvée dans une cohorte de 350 prélèvements issus d'une population témoin. Deux mutations étaient présentes chez plusieurs familles non apparentées issues du sous continent indien. Le tableau 12 résume les caractéristiques cliniques et les mutations de la cohorte. La littérature concernant *TTC37* était inexistante et les bases de données mentionnaient une protéine prédite de 1564 acides aminés, composée de domaines TPR (domaine dégénéré impliqué dans les interactions protéine/protéine) et de fonction inconnue. De ce fait, en dépit de quelques hypothèses, notamment d'une fonction protéine chaperonne, la caractérisation de *TTC37* comme responsable de DS/THE n'a pas permis dans un premier temps, d'éclairer les bases physiopathologiques. On peut noter que Hartley et coll. ont étendu le phénotype avec la caractérisation, chez quelques patients, d'anomalies des plaquettes et de cardiopathies congénitales.

Compte tenu du chevauchement de la zone incriminée par Hartley et coll. avec la zone que nous explorions, nous avons séquencé *TTC37* dans notre cohorte. A ce moment, la cohorte était de 12 patients, du fait de l'inclusion de 3 nouveaux patients français et d'un patient turc. Par séquençage direct, 12 mutations différentes ont été

Tableau 12 : Caractéristiques cliniques et mutations des patients de la publication de Hartley et Coll.

Identifiant	1C	1D	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C	11C
Ethnie	Inde	Inde	Pays-Bas	Pakistan	Kurde	Pakistan	Pakistan	Pakistan	Royaume-Unis	Italie	Belgique	Pakistan
Sexe	F	F	M	F	F	M	F	M	M	F	M	M
Terme	40	40	35	34	34	30		40	37	33	34	35
RCIU	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Diarrhée grave rebelle	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Anomalies des cheveux	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Trichorhexis nodosa	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Dysmorphie faciale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Anomalies immunitaires	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Atteinte hépatique	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui			Non	Non	Non	Non
Atteinte cutanée	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Mutation	c.2808G>A/ c.2808G>A	c.2808G>A/ c.2808G>A	c.3847G>A	c.2779-2A>G/ c.2779-2A>G/	c.1632+1delG/ c.1632+1delG	c.2779-2A>G/ c.2779-2A>G/	c.751G>A/ c.751G>A	c.2808G>A/ c.2808G>A	c.1300_1301del /c.4514T>C	c.439C>T /c.2251C>T	c.3847G>A	c.2808G>A/ c.2808G>A
Exon	28/28	28/28	37/ ?	28/28	17/17	28/28	10/10	28/28	15/42	8/21	37/ ?	28/28
Type	Stop/Stop	Stop/Stop	Faux sens/ ?	Epissage/Epissage	Epissage/Epissage	Epissage/Epissage	Faux sens(epissage)/ Faux sens(epissage)	Stop/Stop	Délétion/ Faux sens	Stop/stop	Faux sens/ ?	Stop/Stop

mises en évidence chez 9 patients : 1 mutation stop, 3 micro-délétions, 3 mutations faux sens et 5 mutations altérant un site d'épissage.

Pour 3 des mutations localisées sur un site d'épissage, l'analyse des transcrits a pu être réalisée : dans 1 cas, elle entraînait la disparition de l'exon 25 en respectant le cadre de lecture. Dans les autres cas, elles induisaient un décalage du cadre de lecture avec création d'un codon stop prématuré.

Chez 3 patients, l'analyse des exons et des régions péri-exoniques ne mettait pas en évidence de variation de séquence délétère, notamment pour le patient ZEI chez qui, pour mémoire, le locus 5q n'était pas impliqué dans l'analyse de liaison. Nous avons alors réalisé une analyse en puce de CGH array (contenant 17 sondes pour *TTC37*) de type Agilent 2X400K sureprint chez les patients ne présentant pas de mutation, sans mettre en évidence de variation du nombre de copies. Le tableau 13 résume les caractéristiques cliniques des patients et les mutations.

A la suite de ces études, une partie des cas de syndromes DS/THE a donc pu être liée à des mutations du gène *TTC37*, codant pour une protéine à motifs TPR, dont le rôle, la fonction et la localisation cellulaire étaient inconnus. A l'exception des populations issues du sous-continent Indien, il n'existe pas de mutation récurrente. Pour les patients ne présentant pas de mutation de *TTC37* mais ayant un phénotype concordant pour un DS/THE, nous avons suspecté l'existence d'au moins un autre gène. Le nombre de patients négatifs pour *TTC37* a, par la suite, été porté à 6 avec l'inclusion de nouveaux cas (Tableau 14).

La détermination des mutations de *TTC37* a fait l'objet d'une publication en 2011 dans *Human Mutation* (Fabre et coll 2011) présentée en annexe.

Tableau 14 : Signes cliniques des patients présentant un DS/THE selon la présence ou l'absence de mutation dans *TTC37*

	Patients ayant 2 mutations dans <i>TTC37</i>, n=12 (Hartley et al.)	Patients ayant 2 mutations dans <i>TTC37</i>, n=10 (Fabre et al.)	Patients sans mutation dans <i>TTC37</i> n=6
Consanguinité	8/12	5/10	4/6
Sexe	6F/6M	6F/4M	5F/1M
RCIU	6/9	4/10	4/6
Diarrhée grave rebelle	12/12	10/10	6/6
Age de début (Semaine)		7.4	2.5
Anomalies des cheveux	12/12	10/10	6/6
Présence de Trichorhexis nodosa	12/12	8/9	5/5
Dysmorphie faciale	12/12	10/10	6/6
Anomalies immunitaires	9/10	9/9	3/6
Atteinte hépatique	5/10	4/10	3/6
Atteinte cutanée	4/12	3/6	$\frac{3}{4}$

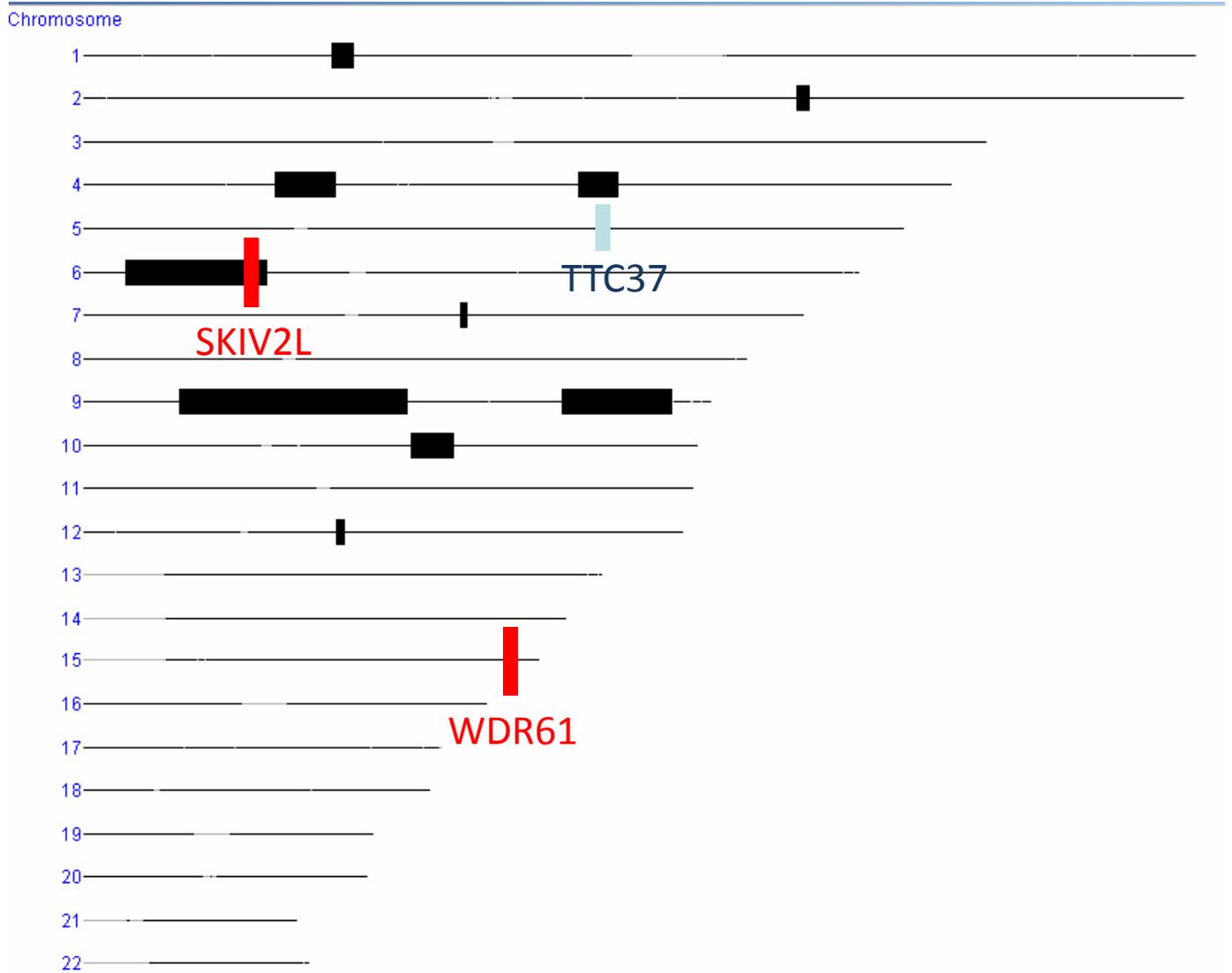
Caractérisation du second locus

Par la suite, nous avons cherché quels gènes pouvaient être de bons candidats dans la seconde région d'intérêt. Dans un premier temps, deux gènes composés de domaines TPR comme *TTC37*, *TTC4* et *TTC22* ont été explorés. *TTC4* est un co-facteur d' HSP-90 (Crevel et coll. 2008), et *TTC22* est un gène conservé chez les vertébrés et codant pour une protéine de fonction inconnue. Nous n'avons pas retrouvé de variations délétères pour ces deux gènes.

Nous avons donc cherché d'autres pistes et exploré l'information selon laquelle, dans certaines bases de données, *TTC37* est rapporté comme étant l'orthologue de *SKI3*, un gène de levure codant pour une protéine faisant partie du complexe SKI (Brown et coll. 2000). Chez la levure, ce complexe multi protéique constitué d'une molécule de Ski3, d'une de Ski2 et de deux unités de Ski8, est impliqué dans la surveillance des ARNm (Synowsky et coll. 2008). Il existe un orthologue humain de *SKI2* : *SKIV2L* situé en 6p21.32 et un orthologue humain de *SKI8* : *WDR61* situé en 15q25.1. En croisant cette information avec les résultats de l'analyse de liaison du patient ne présentant pas de mutation de *TTC37*, nous avons découvert que *SKIV2L* était situé dans la région candidate la plus fortement liée à la pathologie (Figure 9). Un séquençage direct de *SKIV2L* chez les patients négatifs pour *TTC37* a donc été réalisé.

Pour les 6 patients, 8 variations de séquences exoniques non référencées ont été caractérisées : 3 mutations créant un codon stop prématuré, 1 mutation faux sens dans une région fonctionnelle conservée, 1 insertion et 3 délétions conduisant à un décalage du cadre de lecture. La ségrégation familiale était toujours compatible avec une transmission récessive. La figure 10 rapporte les schémas des gènes *TTC37* et *SKIV2L* avec les mutations décrites à ce jour.

Figure 9 : Résultats de la recherche de régions d'homozygotie dans la famille ZET avec les localisations de *SKIV2L*, *TTC37* et *WDR61*



Les résultats de ce travail ont été publiés en 2012 dans l'American Journal of Human Genetics (Fabre et coll. 2012) et sont présentés en annexe.

La parution de cette publication et de la précédente, a incité plusieurs équipes à nous solliciter pour réaliser un diagnostic moléculaire de DS/THE et nous a donc permis d'inclure de nombreux autres patients.

Conclusion

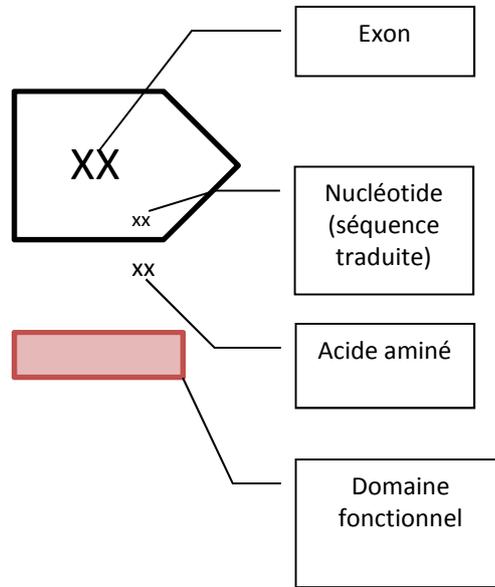
En nous basant sur une homologie de la séquence protéique de TTC37 avec Ski3, nous avons émis l'hypothèse que les orthologues des autres gènes impliqués dans la constitution du complexe SKI chez la levure pouvaient être potentiellement responsables des DS/THE. Grâce à l'analyse de liaison réalisée, nous avons pu cibler *SKIV2L* qui s'est révélé être muté chez tous les patients présentant un tableau de DS/THE sans mutation dans *TTC37*. Ces éléments suggèrent que *TTC37* interagit avec *SKIV2L*. En effet le phénotype causé par une altération de l'un ou l'autre des gènes est strictement identique.

La DS/THE est donc une maladie homogène sur le plan clinique mais hétérogène sur le plan génétique et potentiellement causée par une altération du complexe SKI dans lequel interagissent *TTC37* et *SKIV2L*.

L'implication de *TTC37* et de *SKIV2L*, permet, d'ores et déjà, de réaliser un diagnostic de certitude pour les patients et de proposer un dépistage anténatal et un dépistage des apparentés à risque. Par ailleurs, ces descriptions étayent l'existence du complexe SKI chez l'Homme et permettent d'envisager d'étudier les mécanismes physiopathologiques en jeu par la conception de modèles cellulaires et animaux.

Figure 10 : Schéma des gènes *TTC37* (a) ou *SKIV2L* (b) humain

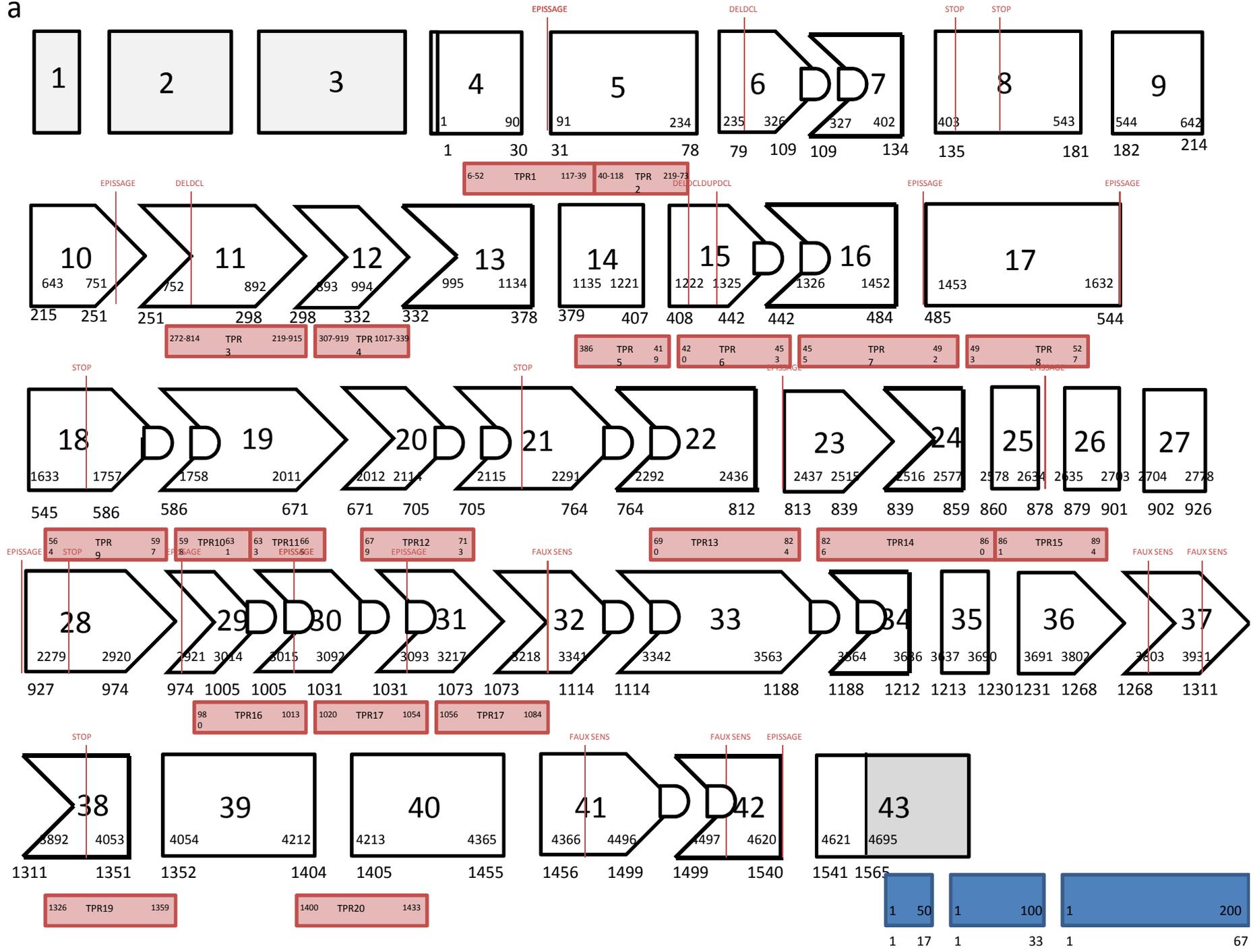
Légende :



DCL : décalage du cadre de lecture

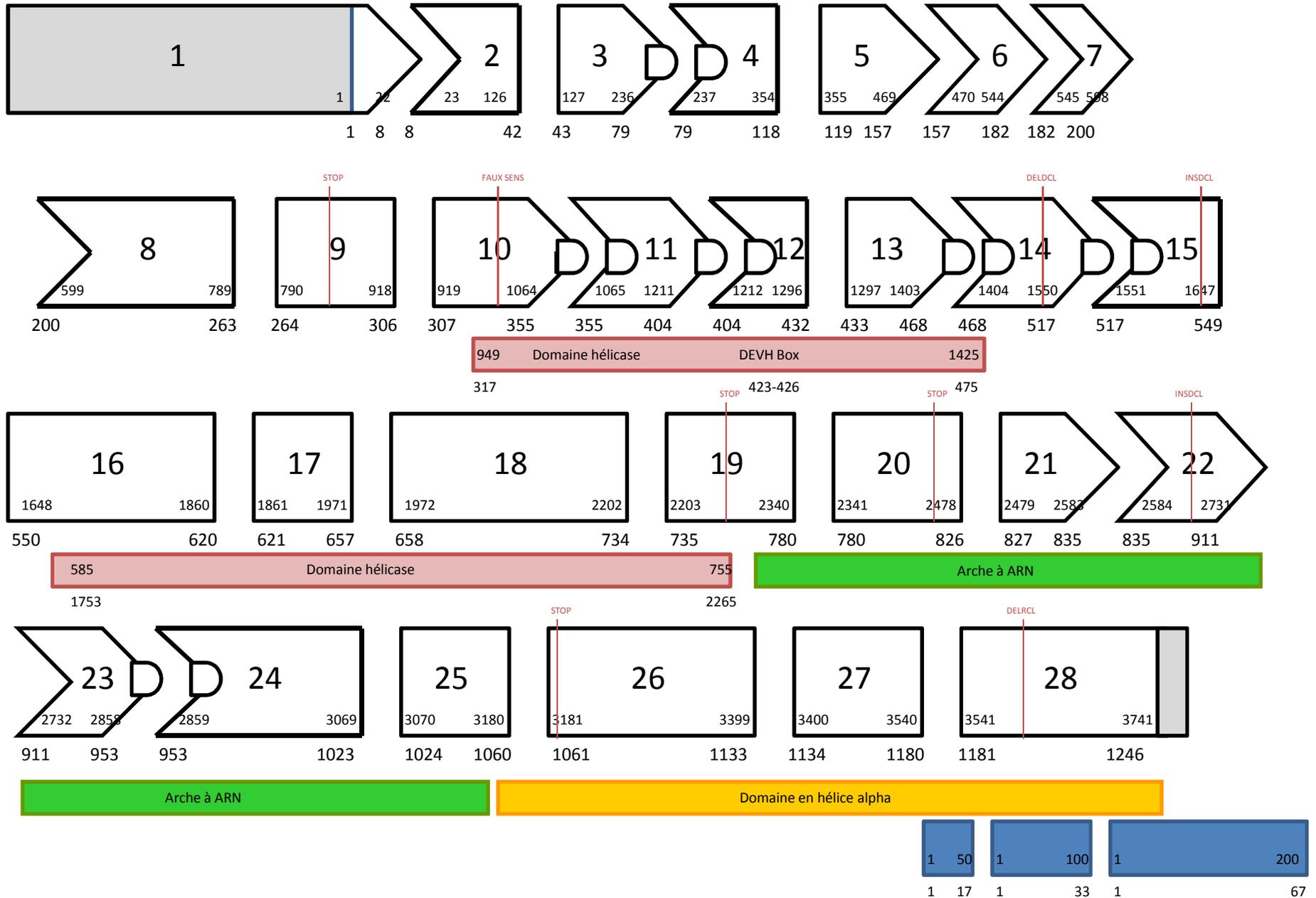
RCL : respect du cadre de lecture

a



1 17 1 33 1 67

b



Etude fonctionnelle

Le complexe SKI humain est peu connu. Les seules données disponibles sont celles publiées par Qu et coll. en 1998 et Zhu et coll. en 2005 qui sont partiellement contradictoires.

En 1998, les premières descriptions de l'exosome paraissaient chez la levure alors que le complexe SKI n'avait pas encore été décrit. Qu et coll. ont rapporté l'homologie entre le gène de levure *SKI2* et le gène humain *SKIV2L* et ont décrit que *SKIV2L* était localisé dans le cytoplasme et le nucléole et était associé dans le polysome avec la sous unité 40S du ribosome.

Sept ans plus tard, Zhu et coll., en étudiant le complexe PAF, ont démontré que TTC37, qu'ils nomment hSKI3, était associé à ce complexe. Ils ont également fait la preuve de l'existence du complexe SKI humain en immuno-précipitation, mis en évidence une localisation cytoplasmique et partiellement nucléaire de hSKI3 et une localisation nucléaire et cytoplasmique de hSKI8. Enfin, leurs travaux concluent que le complexe SKI et le complexe PAF interagissent et sont associés avec les gènes en cours de transcription.

Ces deux études sont les seules à étudier des modèles humains. Elles montrent l'existence d'un complexe SKI humain, probablement composé de *SKIV2L*, *TTC37*, *WDR61*, localisé essentiellement dans le cytoplasme et présentant peut être une activité nucléaire qui n'existe pas chez la levure.

Ces données sont malheureusement assez incomplètes, car, d'une part, en 1998, Qu et coll, ignoraient l'existence du complexe SKI, d'autre part, l'objectif de Zhu et coll. était en premier lieu l'étude du complexe PAF. Les co-facteurs du complexe SKI ne sont étudiés que du fait de leur interaction avec le complexe PAF. Le fait que dans leur article, Zhu et coll utilise hSki3 pour dénommer TTC37 a contribué au fait

que *TTC37* n'ait pas été correctement identifiée lors des premières découvertes de mutations de ce gène dans les DS/THE.

Nous avons tenté, dans la suite de ce travail, d'étudier l'expression des sous-unités du complexe SKI : *TTC37*, *SKIV2L* et *WDR61*, dans des lignées cellulaires saines et issues de patients DS/THE.

Matériel et méthode

Etudes des transcrits

Etude de l'expression de *TTC37*, *SKIV2L*, *XRN1* chez les sujets ayant une DS/THE, les apparentés hétérozygotes et les témoins

L'ARN de 4 patients ayant une mutation de *TTC37*, de 3 patients ayant une mutation de *SKIV2L*, de 4 apparentés hétérozygotes et de 9 témoins, a été extrait en utilisant du TRIZOL (TRI REAGENT, MRC, protocole <http://www.mrcgene.com/tri.htm>). Une RT-PCR avec le kit sigma M-MLV reverse transcriptase d'INVITROGEN, selon le protocole donné par le fournisseur, a été réalisée.

Des sondes TAQMAN commerciales ont été utilisées (références HS00894682_m1 pour *TTC37*, HS00180757_m1 pour *SKIV2L*, HS00404871_m1 pour *XRN1* et HS02758991_g1 pour *GAPDH* qui a servi de gène de référence). Les qPCR ont été effectuées sur un LC480 (Roche) en utilisant le programme TAQMAN Simplex.

Etude du transcriptome de 8 patients sur biopuce (puce SurePrint, Affimetrix)

Une étude du transcriptome a été réalisée sur des ARN totaux issus de lignées lymphoblastoïdes pour 5 patients mutés en *TTC37*, 3 en *SKIV2L* et 8 témoins (Tableau 15). Le même jour et sur une culture de lymphocytes frais, nous

Tableau 15 : Génotypes des patients inclus dans l'analyse du transcriptome

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Gènes atteints	<i>TTC37</i>	<i>TTC37</i>	<i>TTC37</i>	<i>TTC37</i>	<i>TTC37</i>	<i>SKIV2L</i>	<i>SKIV2L</i>	<i>SKIV2L</i>
Mutations	c.3960C> A	c.287_291 del	c.2515+1G >C	c.3808C> G	c.3015- 1G>A c.4454T> G	c.1635_16 36insA,	c.848G>A c.1022T> G	c.1434del

avons extrait l'ARN de 8 patients et de 8 témoins en utilisant du TRIZOL (TRI REAGENT, MRC, protocole <http://www.mrcgene.com/tri.htm>).

Le transcriptome a été réalisé sur la plateforme de l'IFR125 sur puce SurePrint G3 Human GE 8x60k Microarray, (référence : G4858A-028004) selon les protocoles des fournisseurs. L'analyse a été faite avec le logiciel Genespring (Agilent).

Plasmide incluant l'ADNc de *TTC37* porteur d'une étiquette GFP

Nous avons opté pour le plasmide incluant l'ADNc de *TTC37* portant une étiquette en C-terminal. Il s'agit du plasmide GFP-tagged ORF clone of Homo sapiens *TTC37* d'ORIGENE (référence RG208932). Le plasmide a été transfecté dans des E. Coli pour multiplication. Puis, après sélection de deux colonies ayant intégré le plasmide, la séquence du plasmide a été contrôlée. Nous avons purifié le plasmide avec le kit Midi-Prep de Quiagen et transfecté des cellules de type HUVEC. 400 000 cellules ont été transfectées avec 2.3 µgde peGFP**TTC37* avec le kit AMAXA HuvecNuclefactor. L'analyse a été réalisée 48 heures après la transfection.

Etude de la localisation cellulaire

Obtention des lames

Après culture, des cellules lymphoblastoïdes et des fibroblastes ont été fixés sur lame. La fixation se fait dans du PAF à 4% pendant 10 minutes, lavage au PBS et déshydratation dans des bains d'éthanol à concentration croissante (75, 90, 100) pendant 5 minutes. Les lames sont conservées à -80 °C.

Immunomarquage

Les lames obtenues sont perméabilisées par une solution PBS+Triton 0.1% pendant 20 minutes, puis placées dans une solution PBS+BSA 0.5% pendant 30

minutes. L'anticorps primaire est dilué dans un PBS+BSA 0.5% puis incubé pendant 3 heures. Après un lavage au PBS, on incube la lame avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS+BSA pendant 1 heure.

Immunohistochimie

Sur des lames de tissus (Intestin et vésicule biliaire) fixées au formol, les anticorps anti-TTC37, anti-SKI2 et anti-SKI8 ont été testés. Le protocole est donné par Atlas Antibodies <http://www.atlasantibodies.com/pdf/protocols/IHC-protocol-for-polyclonal-antibodies.pdf>.

Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre TTC37

Nous avons sélectionné 3 peptides de TTC37 dont la séquence est peu conservée entre le rat et l'homme. Il s'agit de peptides comprenant les résidus 152-170 (8 variations sur 19), 728-747 (5 variations sur 19), et 1304-1323 (8 variations sur 19). Ces peptides ont été synthétisés par Schafer-N (<http://www.schafer-n.com/>). Les 3 peptides ont été couplés à l'ovalbumine de poule, puis injectés dans un rat avec une immunisation en deux temps. Ensuite, une fusion des lymphocytes extraits de la rate du rat avec la lignée de myélome non sécrétant X63-Ag8-656, et un criblage par Elisa sur les peptides immunogènes ont été réalisés. Ceci a permis d'isoler 184 clones spécifiques (issus de 30 préclones de 728-747 et 26 clones issus de 3 préclones de 1304-1323, aucun préclone issu du premier peptide n'ayant pu être isolé). Dans un second temps, nous avons sélectionné les clones qui marquaient le cytoplasme en cytométrie de flux soit 30 clones. Les 30 clones ont été testés sans dilution en immunomarquage.

Résultats

Expression des transcrits

Expression des transcrits de TTC37 sur un panel de tissus sain

Le panel HMRT102 (Origene) contient des ARNm issus de 34 tissus (Amygdale, Artère intracrânienne, Cerveau, Cœur, Colon, Duodénum descendant, Estomac, Foie, Ganglion lymphatique, Glande surrénale, Hypophyse, Intestin grêle, Langue, Lymphocytes, Moelle épinière, Moelle osseuse, Muscle, Nerf optique, Œsophage, Pancréas, Peau, Péricarde, Placenta, Poumon, Rate, Rectum, Rein, Rétine, Thymus, Thyroïde, Trachée, Urètre, Veine cave, Vessie).

Les niveaux d'expression obtenus varient entre 0,05 et 8. Parmi les tissus ayant une faible ou très faible expression, on peut noter la trachée, le muscle et le foie ; à l'inverse, les tissus ayant une forte expression sont la veine cave, les ganglions lymphatiques, l'hypophyse et l'artère intracrânienne (Figure 11).

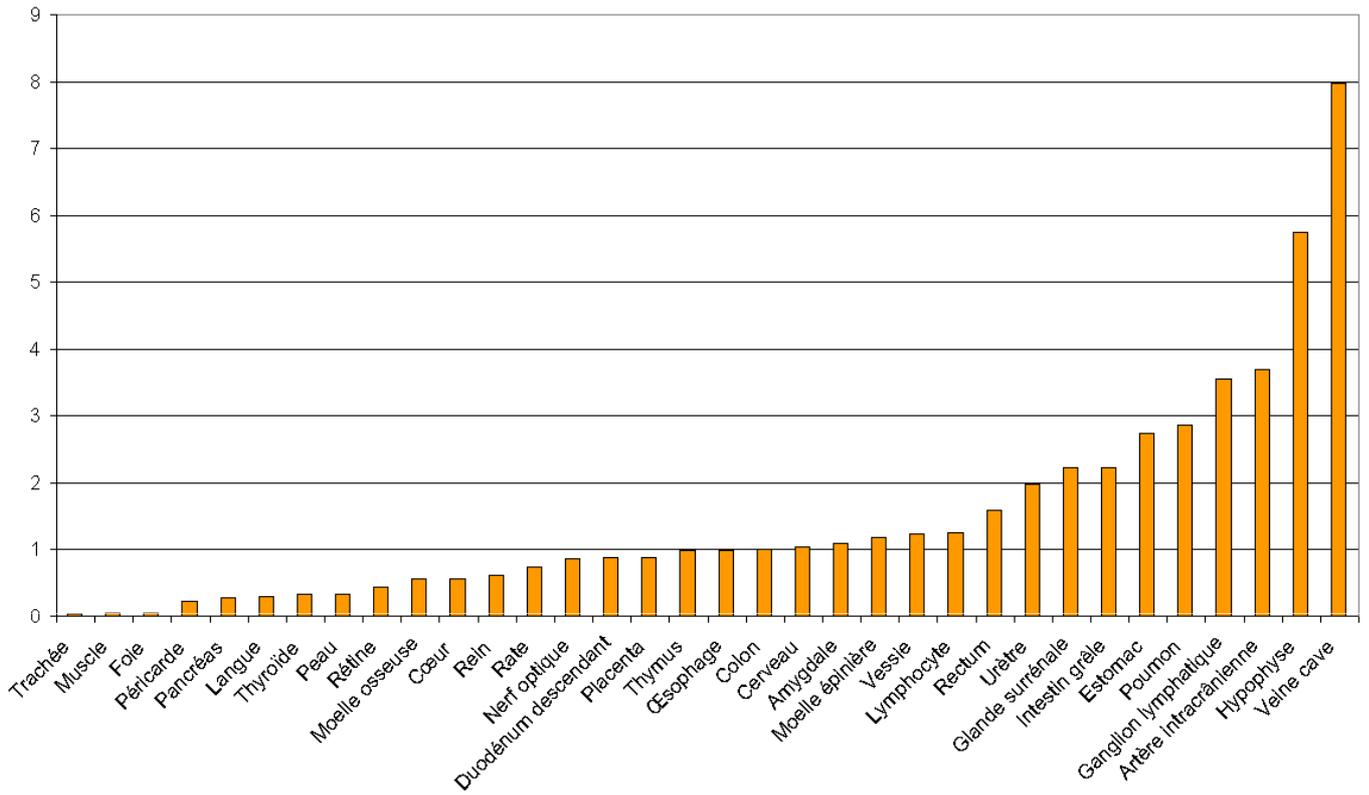
TTC37 a une expression qui semble ubiquitaire dans les tissus humains. De manière étonnante, le foie, qui est un des organes atteints dans les DS/THE, montre un niveau d'expression bas des transcrits, ce qui pourrait faire supposer que l'atteinte hépatique est secondaire et non primitive dans ce syndrome.

Etude de l'expression de TTC37, SKIV2L, XRN1 chez les sujets ayant une DS/THE, les apparenté hétérozygotes et les témoins (Figure 12).

Dans les cellules présentant une anomalie de *SKIV2L* on a noté une diminution de 70% de l'expression de *SKIV2L*, mais aussi de *TTC37* (40 %) et de *XRN1* (60%). Les hétérozygotes pour *SKIV2L* avaient un taux intermédiaire d'expression de *SKIV2L*, un taux d'expression de *TTC37* diminué de 40 % et un taux

Figure 11 : Niveau d'expression des transcrits de *TTC37* sur un panel de tissus sains

Expression de *TTC37* sur ADNc issus de panel de tissus témoins



de *XRN1* normal. Dans les cellules mutantes pour *TTC37*, les niveaux d'expression de *SKIV2L*, *TTC37* et *XRN1* sont tous diminués de 70%. L'analyse statistique (test de Kruskal-Wallis, Biostatgv) montrait que les 3 groupes mutés en *TTC37*, mutés en *SKIV2L* et hétérozygotes en *SKIV2L* présentaient des différences significatives dans les niveaux d'expression. (Figure 12 et Tableau 16)

Recherche de transcrits alternatifs de *TTC37*

Nous avons recherché l'existence de transcrits alternatifs de *TTC37* car certaines bases de données (notamment Ensembl.org) indiquaient l'existence de transcrits alternatifs plus courts, l'un constitué des exons 1-19 et l'autre des exons 1-7. Nous avons donc réalisé sur des ADNc issus de cellules lymphoblastoïdes des PCR multiples longues couvrants les exons 11-25, 25-36, 36-41, et des PCR moyennes couvrants les exons 4-12, 9-17, 15-21, 18-27, 22-32, 29-37, 34-42, 38-43. Nous n'avons pas mis en évidence de transcrits alternatifs.

Etude du transcriptome de 8 patients sur biopuce (puce SurePrint, Affimetrix)

Nous avons étudié le transcriptome de patients ayant une DS/THE. Pour cela, nous avons inclus 8 patients (5 ayant une mutation de *TTC37*, 3 ayant une mutation de *SKIV2L*) afin de caractériser des gènes ou des voies affectées par l'altération du complexe SKI.

Lors de l'analyse des 8 patients contre les témoins en double couleur, nous avons retrouvé 123 sondes présentant une variation significative d'au moins un facteur 3 entre les patients et les témoins. Ces 123 sondes correspondaient à 25 LincRNA et 80 gènes. Sur les 123 sondes, 8 étaient dérégulées négativement et 115

Figure 12 : Niveau d'expression des transcrits de *TTC37*, *SKIV2L* et *XRN1* dans des cellules lymphoblastoïdes issues de patients DS/THE (4 portant des mutations dans *TTC37* et 3 portant des mutations dans *SKIV2L*, d'apparentés hétérozygotes (1 portant des mutations dans *TTC37* et 3 dans *SKIV2L*) et de 6 contrôles

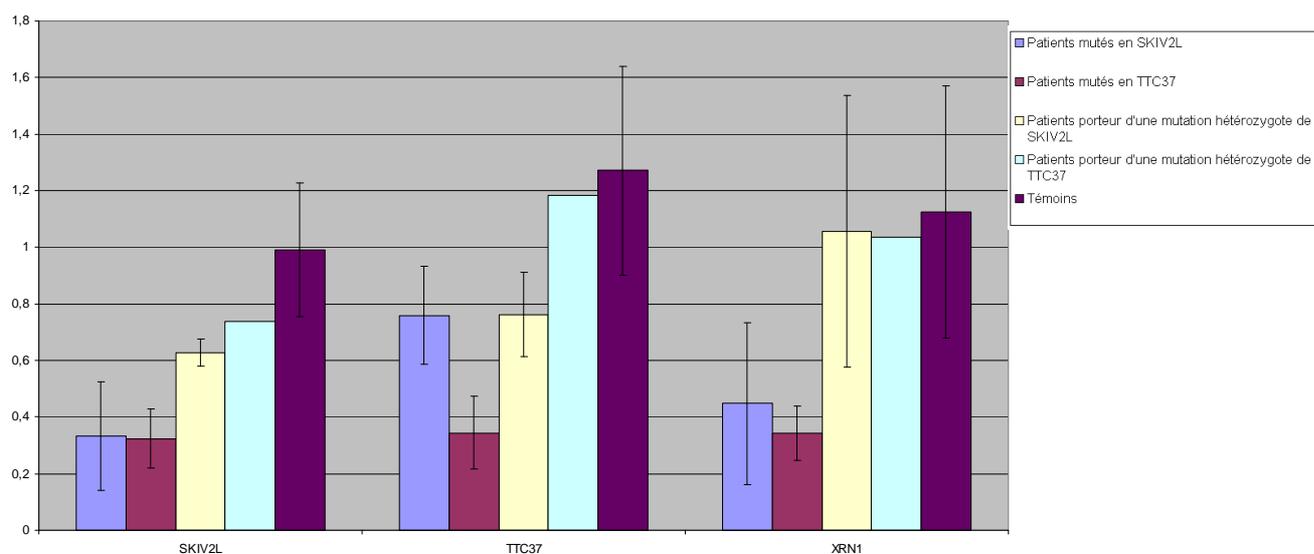


Tableau 16 : Pourcentage des niveaux d'expression de *TTC37*, *SKIV2L* et *XRN1* dans les cellules lymphoblastoïdes de patients DS/THE, d'apparentés hétérozygotes et de témoins

	Patients mutés en <i>SKIV2L</i> (n=3)	Patients mutés en <i>TTC37</i> (n=4)	Patients porteurs d'une mutation hétérozygote de <i>SKIV2L</i> (n=3)	Patients porteurs d'une mutation hétérozygote de <i>TTC37</i> (n=1)	Témoins (n=6)	p
<i>SKIV2L</i>	0,33403127	0,32394407	0,62654561	0,73829659	0,99113753	0,005
<i>TTC37</i>	0,75883049	0,34431815	0,7614896	1,18171869	1,27068391	0,005
<i>XRN1</i>	0,44771426	0,34447487	1,05561959	1,03545951	1,12475805	0,02

positivement. Il n'a pas été retrouvé de perturbation spécifique d'une voie. L'analyse ciblée sur les 5 patients ayant deux mutations de *TTC37* a retrouvé 19 sondes dérégulées (7 négativement et 11 positivement), correspondant à 12 gènes et 2 LincRNA. L'analyse des 3 patients ayant une mutation de *SKIV2L* n'a pas retrouvé de variation statistiquement significative de l'expression des sondes. Les résultats sont présentés à la fin de ce chapitre dans les tableaux 17 et 18.

L'analyse du transcriptome sur puce n'a pas mis en évidence de perturbation d'une voie métabolique ou de signalisation particulière, peu de gènes ont été retrouvés modifiés et étaient essentiellement surexprimés. La quantité de LincRNA surexprimée (environ 20% du total) est le reflet du nombre de LincRNA sur la puce et ne semble donc pas signaler une majoration de l'ARN non codant secondaire à une diminution de leur dégradation.

Etude de la localisation cellulaire de *TTC37* et de *SKIV2L*

Plasmide portant une étiquette GFP

Après transfert de ce plasmide, on obtient une expression de la GFP cytoplasmique et peri-nucléaire avec un hypersignal intense qui co-localise avec l'appareil de Golgi (Figure 13).

Cette localisation est cohérente avec les données concernant les localisations des orthologues chez la levure. Cette localisation strictement cytoplasmique est partiellement en contradiction avec les données de Zhu et coll. 2005 qui montraient une localisation partiellement nucléaire chez l'homme. La présence d'un hypersignal qui co-localise avec l'appareil de Golgi peut être un artefact dû à la surexpression ou indiquer une plus grande activité du complexe SKI dans les zones de traduction.

Figure 13a : Transfection de cellules HUVEC avec un plasmide codant pour *TTC37/GFP*

- a) GFP
- b) Marquage nucléaire au DAPI

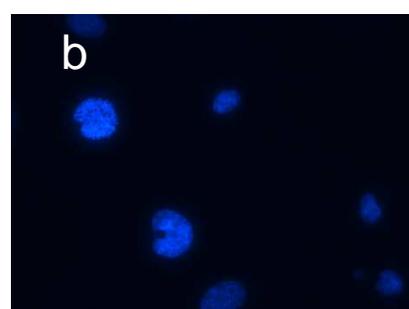
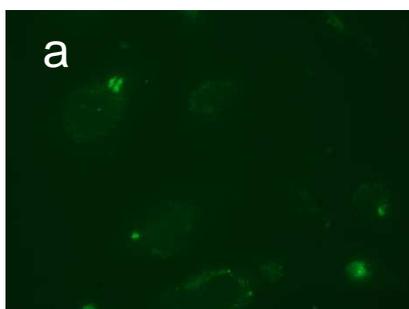
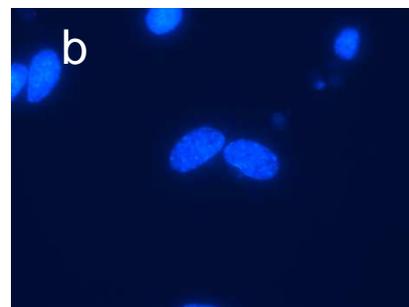
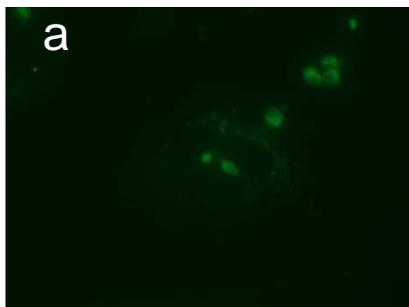
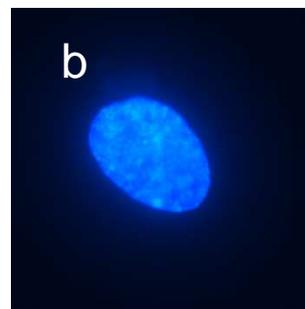
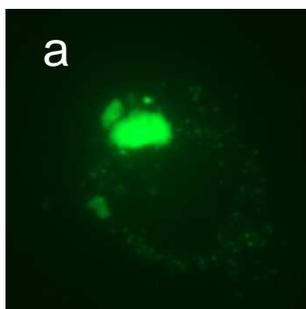


Figure 13b : Transfection de cellules HUVEC avec un plasmide codant pour *TTC37/GFP*

- a) GFP
- b) Marquage nucléaire au DAPI
- c) Marquage anticorps anti golgi (anti GML30 sigma Aldrich)
- d) Fusion

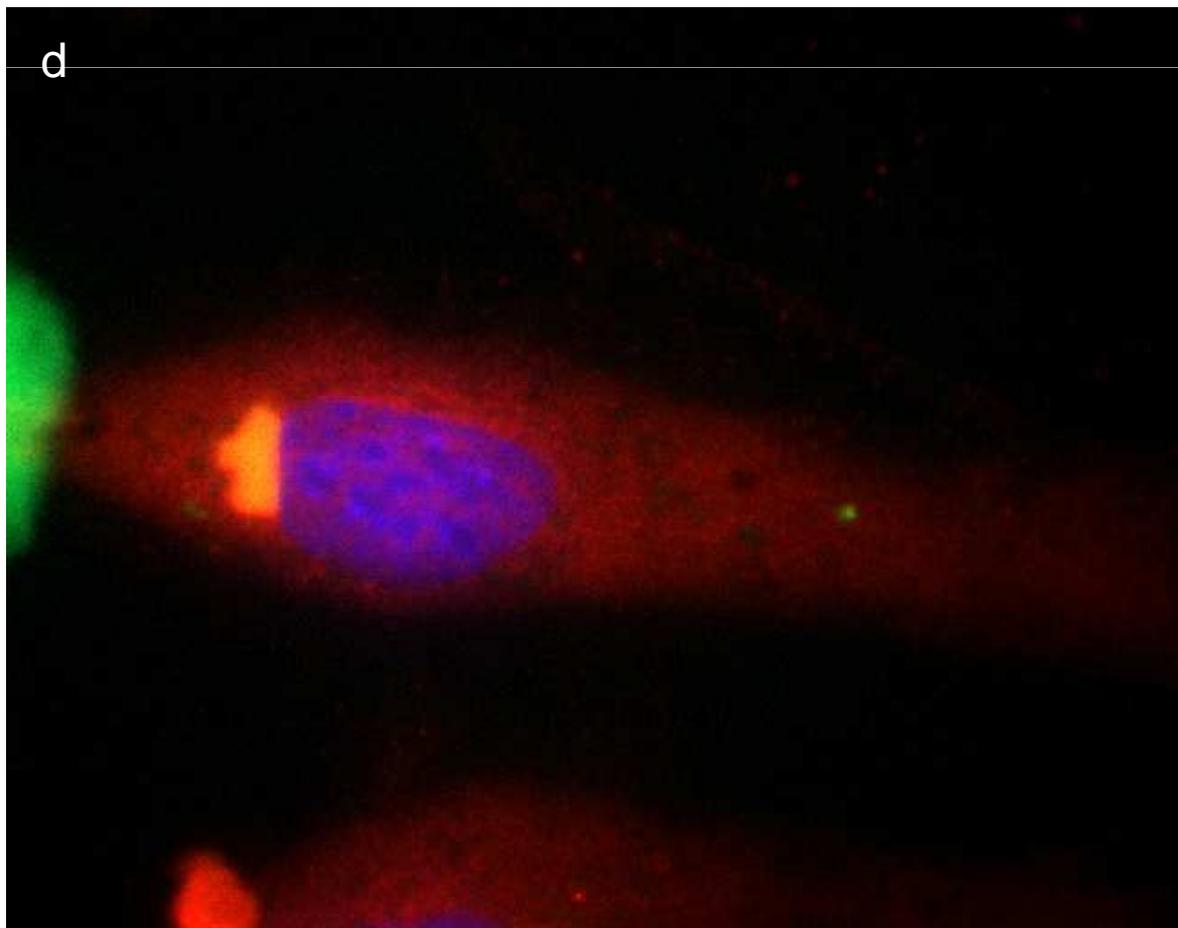
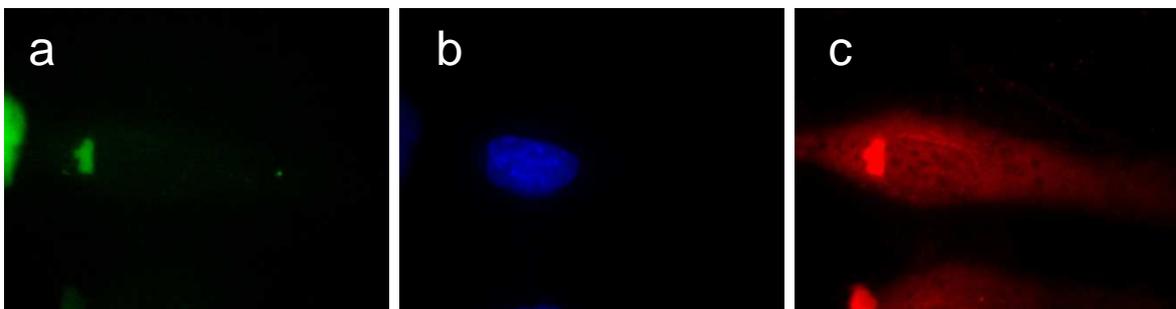
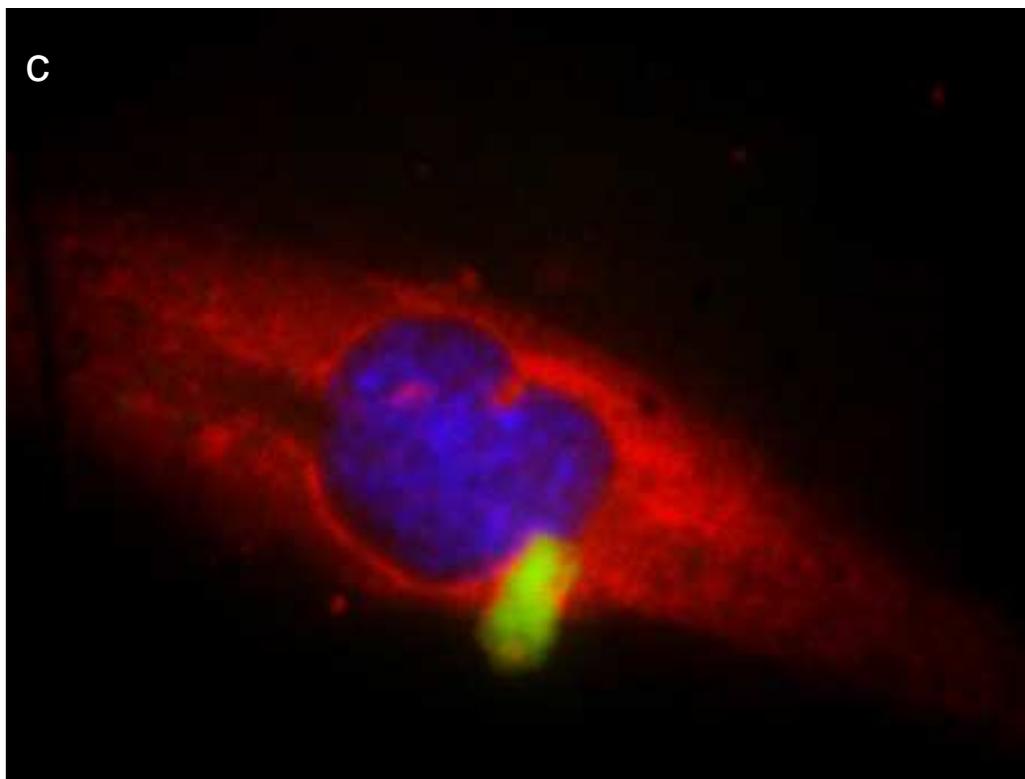
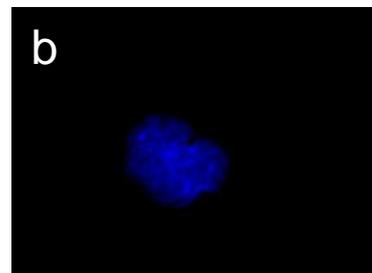
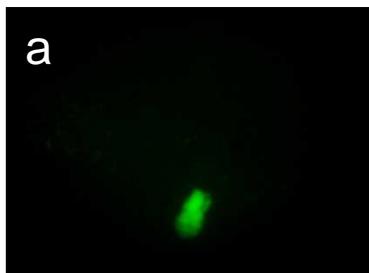


Figure 13c : Transfection de cellules HUVEC avec un plasmide codant pour *TTC37/GFP*

- a) GFP
- b) Marquage nucléaire au DAPI
- c) Fusion



Etude de la localisation en Immunocytologie

TTC37 : Anticorps poly-clonaux

Il existait début 2012 deux anticorps poly-clonal pour TTC37 disponibles dans le commerce. Le premier, un anticorps poly-clonal de lapin, est proposée par Sigma Aldrich et a été développé dans le cadre du projet protein-atlas (<http://www.proteinatlas.org/>). Le second, développé par Santacruz biotechnology est un anticorps poly-clonal de chèvre.

Anticorps poly-clonal de lapin

Il s'agit d'anticorps de lapin immunisé à partir d'un peptide correspondant aux acides aminés 459-557 de TTC37. Cet anticorps est utilisable en immunocytologie et en immunohistochimie d'après le fabricant. Cependant, les données du projet « protein-atlas » sont assez contradictoires. En effet, alors que la localisation est cytoplasmique en immunohistochimie, elle est majoritairement nucléaire (et non nucléolaire) en immunocytologie. Dans nos essais sur les lames de témoins, la localisation était en effet nucléaire et non cytoplasmique mais les résultats étaient peu reproductibles..

Anticorps polyclonal de chèvre

Cet anticorps est obtenu à partir d'un fragment interne à TTC37 (sans précision donnée par le fournisseur). Il est commercialisé pour une utilisation en ICC et WB. L'anticorps a été testé à des dilutions de 1/100 à pur. Nous l'avons également testé avec une solution bloquante de sérum de chèvre à la concentration finale de 0.004 mg/ml, sans obtenir de marquage reproductible. Par ailleurs, un essai en

Western Blot montrait un grand nombre de bandes non spécifiques avec l'absence de bande à la taille attendue pour TTC37.

TTC37 Anticorps monoclonaux

Nous avons développé avec le CIML (Luminy Marseille) un anticorps monoclonal de rat. Sur les 30 surnageants testés, 22 produisent un marquage faible et hétérogène, 8 un marquage cytoplasmique fort et une absence de marquage nucléaire (Figure 14). Ces 8 anticorps semblent prometteurs et devront être testés en western blot.

SKIV2L

Il existe également deux anticorps polyclonaux pour SKIV2L disponibles dans le commerce. Le premier, proposé par Sigma Aldrich, est obtenu chez le lapin et l'autre par Santacruz biotechnology est un anticorps polyclonal de chèvre.

Anticorps de lapin

Le peptide immunogène est localisé au niveau des acides aminés 863-912 de SKIV2L. Aucun marquage reproductible n'a été obtenu.

Anticorps de chèvre (sc-169318)

Il s'agit d'un anticorps de chèvre développé à partir d'un fragment C terminal de SKIV2L (sans précision). Là encore, aucun marquage reproductible n'a été obtenu. Par ailleurs, un essai en Western-Blot montrait des bandes non spécifiques avec l'absence de bande à la taille attendue pour SKIV2L.

Figure 14 : Marquage anticorps monoclonaux anti-TTC37 « maison » sur cellules lymphoblastoïdes contrôles:

a) Marquage avec anticorps anti-TTC37

b) Marquage nucléaire au DAPI

c) Marquage cytoplasmique avec anticorps anti-actine

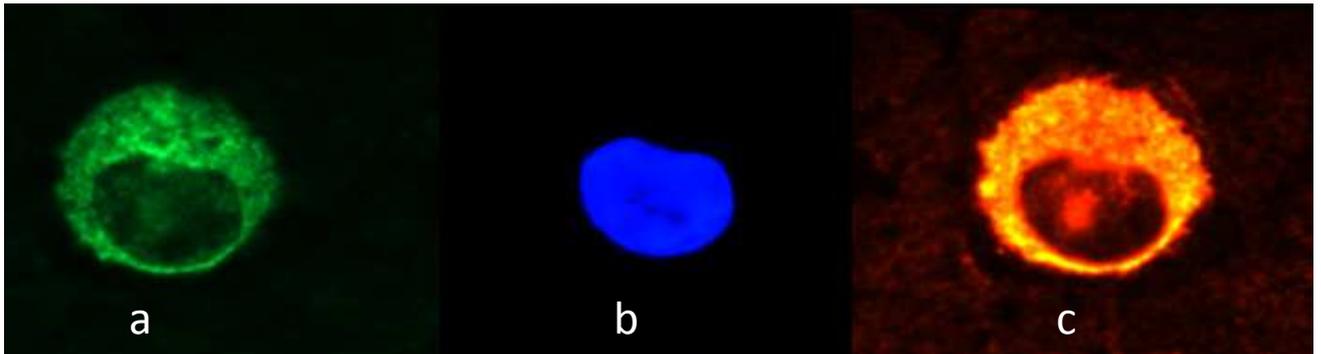
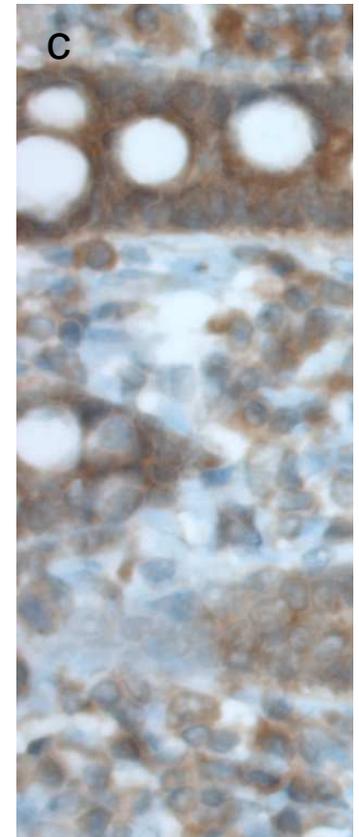
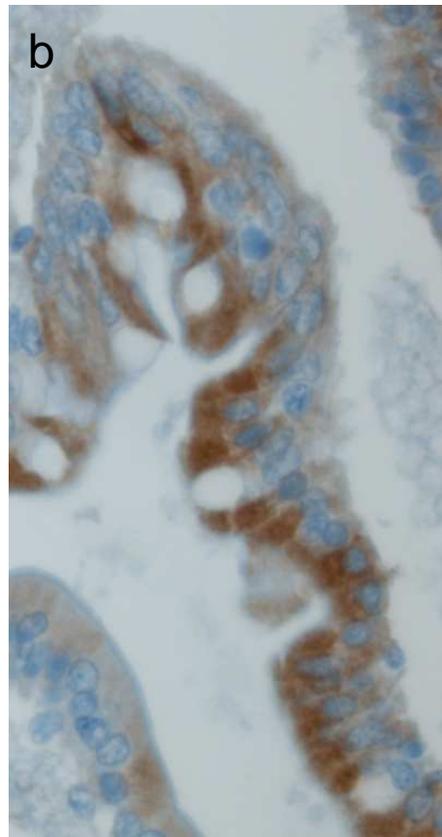
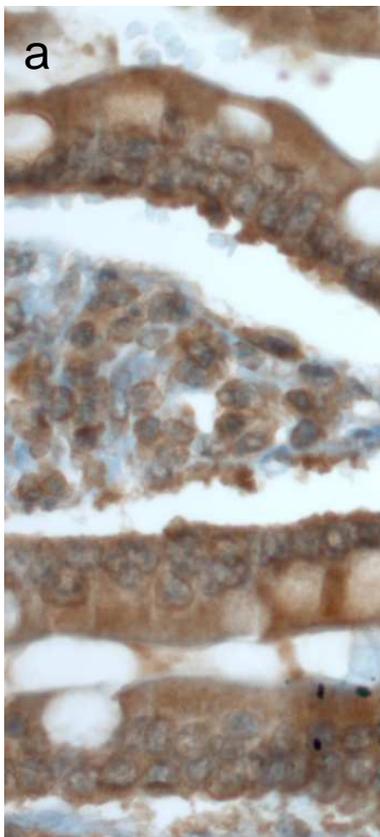


Figure 15 : Immunohistochimie sur épithélium digestif avec les anticorps antiSKIV2L (a) antiTTC37 (b) et anti WDR61 (c) (Protein-Atlas), révélation en brun, contre-coloration à l'hématoxyline



Imunohistochimie

Nous avons noté un marquage cytoplasmique exclusif pour *TTC37* et *SKIV2L*, cytoplasmique et nucléaire pour *WDR61*. Ces données semblent compatibles avec celle de la littérature (Figure 15). La prochaine étape sera de tester les anticorps sur des lames issues de prélèvements de patients.

Discussion

Nous avons tenté de mieux caractériser l'expression de *TTC37* et *SKIV2L*. Au niveau morphologique, les données que nous avons observées plaident pour une localisation cytoplasmique de *TTC37* et de *SKIV2L* avec une possible accumulation dans l'appareil de Golgi. Ces données sont conformes aux connaissances que nous avons chez la levure et partiellement conformes aux résultats antérieurs qui trouvaient une localisation cytoplasmique (et nucléolaire) pour *SKIV2L* (Qu et coll. 1998). Nous avons noté une localisation intense dans le golgi qui n'est peut-être qu'un artefact causé par la surexpression de la protéine avec l'étiquette GFP.

Concernant les études de l'expression quantitative de *TTC37* et de *SKIV2L*, les cellules des patients présentaient une diminution d'un facteur 3 à 4 de l'expression des transcrits par rapport aux témoins. De manière intéressante, les cellules de patients présentaient des taux de *SKIV2L* et de *XRN1* abaissés également. Le fait que les niveaux d'expression des gènes soient abaissés pour l'autre partenaire du complexe SKI semblerait indiquer qu'il existe une inter-régulation de la transcription des co-facteurs du complexe SKI. Zhu et coll notaient également que l'utilisation d'ARNi contre *WDR61* induisait une diminution de l'expression de *TTC37*. Cet élément semble corroborer une régulation globale.

L'étude des transcriptomes n'a pas permis de mettre en évidence une variation d'un groupe de gènes ayant une fonction commune ou appartenant à la même voie

fonctionnelle. Cependant une technique plus adaptée pour explorer l'effet des mutations de *TTC37* et de *SKIV2L* serait la RNA-seq car elle permettrait d'apprécier la quantité totale d'ARNm présents dans les cellules. Cette technique, réalisée chez un modèle d'*Arabidopsis* mutant en *SKI8*, a permis de mettre en évidence une surreprésentation des fragments en 3' par rapport aux fragments 5' (Dorcey et al., 2012).

Paradoxalement, alors que l'on aurait pu penser qu'il y aurait une augmentation de l'activité de la voie 5'-3' de dégradation des ARN lorsque le complexe SKI est atteint, on a noté à l'inverse une diminution des transcrits. Là encore, ce phénomène pourrait suggérer une inter-régulation de la transcription des systèmes de dégradation des ARN.

Tableau 17 : Résultat de l'analyse du transcriptome chez les 5 patients ayant des mutations de *TTC37* : gènes dérégulés d'au moins un facteur 3

Probe Name	Fold change	Regulation	Gene Symbol	Description
A_33_P33032 12	- 3,2225106	down	CCDC74B	Homo sapiens coiled-coil domain containing 74B (CCDC74B), mRNA [NM_207310]
A_23_P25402 5	- 3,3512564	down	ZFP37	Homo sapiens zinc finger protein 37 homolog (mouse) (ZFP37), mRNA [NM_003408]
(+)E1A_r60_n1 1	- 3,4117408	down		Unknown
A_23_P38110 2	- 3,5134218	down	CCDC74B	Homo sapiens coiled-coil domain containing 74B (CCDC74B), mRNA [NM_207310]
(+)E1A_r60_n9	- 5,2909117	down		Unknown
A_24_P39374 0	- 7,7443776	down	FYB	Homo sapiens FYN binding protein (FYB), transcript variant 1, mRNA [NM_001465]
A_23_P73097	- 11,889166	down	RGS20	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 20 (RGS20), transcript variant 1, mRNA [NM_170587]
A_33_P33866 81	3,5809813	up	MS4A13	Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 13 (MS4A13), transcript variant 1, mRNA [NM_001012417]
A_33_P33804 57	4,510761	up	GPR88	Homo sapiens G protein-coupled receptor 88 (GPR88), mRNA [NM_022049]
A_33_P32519 16	5,4479485	up		
A_33_P32237 39	6,3114653	up	OR1N1	Homo sapiens olfactory receptor, family 1, subfamily N, member 1 (OR1N1), mRNA [NM_012363]
A_24_P37637 9	8,909438	up	LOC647323	Homo sapiens hypothetical LOC647323 (LOC647323), non-coding RNA [NR_033944]
A_33_P37634 12	9,400017	up		Homo sapiens cDNA FLJ40109 fis, clone TESTI2007685, [AK097428]
A_19_P00810 261	9,941243	up		lincRNA:chr10:131977935-131987135 reverse strand
A_19_P00810 995	10,366015	up		lincRNA:chr2:111960680-111962218 reverse strand
A_23_P15433 8	10,832606	up	EFHD1	Homo sapiens EF-hand domain family, member D1 (EFHD1), transcript variant 1, mRNA [NM_025202]
A_33_P37447 36	11,942705	up	LOC646736	Homo sapiens similar to Alu subfamily SX sequence contamination warning entry, mRNA (cDNA clone IMAGE:4246459), with apparent retained intron, [BC017935]
A_33_P32943 17	13,073131	up		
A_33_P32894 01	13,260439	up	OR52J3	Homo sapiens olfactory receptor, family 52, subfamily J, member 3 (OR52J3), mRNA [NM_001001916]

Tableau 18 : Résultat de l'analyse du transcriptome chez 8 patients atteints de syndrome DS/THE gènes dérégulés : gènes dérégulés d'au moins un facteur 3

Probe name	p	Regulation	FC Absolute	Gene	Description
A_23_P7309 7	0.0155553 3	down	11,889166	RGS20	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 20 (RGS20), transcript variant 1, mRNA [NM_170587]
A_33_P3262 625	0.0381349 73	down	9,168059	CECR7	Homo sapiens cat eye syndrome chromosome region, candidate 7 (non-protein coding) (CECR7), non-coding RNA [NR_015352]
A_24_P3937 40	0.0307633 78	down	7,7443776	FYB	Homo sapiens FYN binding protein (FYB), transcript variant 1, mRNA [NM_001465]
(+)E1A_r60_ n9	9.065039E- 4	down	5,2909117		Unknown
A_23_P3811 02	0.0396374 28	down	3,5134218	CCDC74B	Homo sapiens coiled-coil domain containing 74B (CCDC74B), mRNA [NM_207310]
(+)E1A_r60_ n11	0.0041489 922	down	3,4117408		Unknown
A_23_P2540 25	0.0468982 27	down	3,3512564	ZFP37	Homo sapiens zinc finger protein 37 homolog (mouse) (ZFP37), mRNA [NM_003408]
A_33_P3303 212	0.0322425 55	down	3,2225106	CCDC74B	Homo sapiens coiled-coil domain containing 74B (CCDC74B), mRNA [NM_207310]
A_19_P0031 7159	0.0098746 84	up	3,0202727	XLOC_004 366	BROAD lincRNAs version v2 (http://www.broadinstitute.org/genome_bio/human_lincrnas/)
A_32_P8935 2	0.0124873 28	up	3,0391965	MACROD2	Homo sapiens MACRO domain containing 2 (MACROD2), transcript variant 1, mRNA [NM_080676]
A_19_P0081 2320	0.0130025 85	up	3,042757		lincRNA:chr5:133837051-133848098 reverse strand
A_19_P0080 6407	0.0069789 463	up	3,0447867		lincRNA:chr4:109621126-109637026 forward strand
A_33_P3223 059	0.0481141 17	up	3,063361		
A_33_P3382 803	0.0325633 25	up	3,1349185	FLJ43390	Homo sapiens hypothetical LOC646113 (FLJ43390), non-coding RNA [NR_015358]
A_19_P0080 3048	0.0069789 463	up	3,140303		lincRNA:chr7:26443400-26488075 reverse strand
A_33_P3383 004	0.0352560 13	up	3,1771648	PSAPL1	Homo sapiens prosaposin-like 1 (gene/pseudogene) (PSAPL1), mRNA [NM_001085382]
A_33_P3386 681	0.0144228 95	up	3,1969123	MS4A13	Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 13 (MS4A13), transcript variant 1, mRNA [NM_001012417]
A_23_P1404 50	0.0373595 88	up	3,203849	SLC27A2	Homo sapiens solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 (SLC27A2), transcript variant 1, mRNA [NM_003645]
A_32_P8327 0	0.0256723 4	up	3,2181892	LOC72798 2	Homo sapiens hypothetical LOC727982 (LOC727982), non-coding RNA [NR_034134]
A_24_P3909 09	0.0130025 85	up	3,3070998	PRX	Homo sapiens periaxin (PRX), transcript variant 2, mRNA [NM_181882]
A_23_P3158 36	0.0256723 4	up	3,3241868	BAIAP2	Homo sapiens BAI1-associated protein 2 (BAIAP2), transcript variant 2, mRNA [NM_017451]

A_33_P3239 295	0.0352560 13	up	3,355827	PRODH	Homo sapiens proline dehydrogenase (oxidase) 1 (PRODH), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA [NM_016335]
A_33_P3242 713	0.0194705 72	up	3,4990742		Homo sapiens cDNA FLJ11996 fis, clone HEMBB1001449. [AK022058]
A_33_P3281 567	0.0312236 85	up	3,5043297	CMAHP	Homo sapiens cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, pseudogene (CMAHP), transcript variant 1, non-coding RNA [NR_002174]
A_33_P3315 342	0.0035305 41	up	3,534594	ARHGEF1 9	Homo sapiens Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 19 (ARHGEF19), mRNA [NM_153213]
A_33_P3318 624	0.0347064 55	up	3,5368772	CTBP2	C-terminal binding protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:2495] [ENST00000530930]
A_23_P6715 1	0.0121334 87	up	3,538989	OLFM2	Homo sapiens olfactomedin 2 (OLFM2), mRNA [NM_058164]
A_23_P2013 86	0.0142056 85	up	3,5552225	DDAH1	Homo sapiens dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1), transcript variant 1, mRNA [NM_012137]
A_33_P3417 667	0.0363908 63	up	3,5817027	C18orf15	Homo sapiens cDNA FLJ31338 fis, clone MAMGL1000184. [AK055900]
A_23_P9256 2	0.0048122 895	up	3,6215134	ADH7	Homo sapiens alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide (ADH7), transcript variant 2, mRNA [NM_000673]
A_24_P3034 20	0.0109166 98	up	3,680811	LOC22144 2	Homo sapiens adenylate cyclase 10 pseudogene (LOC221442), non-coding RNA [NR_026938]
A_23_P7790 8	0.0332682	up	3,6849663	SLC47A2	Homo sapiens solute carrier family 47, member 2 (SLC47A2), transcript variant 1, mRNA [NM_152908]
A_19_P0080 1253	0.0069789 463	up	3,704733		lincRNA:chr12:6274389-6295889 reverse strand
A_24_P4057 05	2.086596E- 4	up	3,705395	SLC2A2	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (SLC2A2), mRNA [NM_000340]
A_24_P6739 5	0.0322425 55	up	3,7115376	KRT8	Homo sapiens keratin 8 (KRT8), mRNA [NM_002273]
A_33_P3365 082	0.0481141 17	up	3,7162108	OR2G6	Homo sapiens olfactory receptor, family 2, subfamily G, member 6 (OR2G6), mRNA [NM_001013355]
A_33_P3258 777	0.0289304 67	up	3,7514796		Homo sapiens hypothetical gene supported by BC010180, mRNA (cDNA clone IMAGE:4310501), with apparent retained intron. [BC010180]
A_33_P3303 102	0.0155553 3	up	3,7905943	MYNN	Homo sapiens cDNA FLJ34703 fis, clone MESAN2002844, highly similar to Homo sapiens myoneurin (MYNN), mRNA. [AK092022]
A_33_P3380 457	0.0195937 38	up	3,881879	GPR88	Homo sapiens G protein-coupled receptor 88 (GPR88), mRNA [NM_022049]
A_19_P0080 8583	0.0256723 4	up	3,9017656		lincRNA:chr18:35719227-36626127 reverse strand
A_33_P3239 332	0.0471490 6	up	3,9289887	LOC28426 0	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6154673. [BC040725]
A_33_P3319 870	0.0297874 29	up	3,9368753	GREM1	Homo sapiens gremlin 1 (GREM1), transcript variant 2, mRNA [NM_001191323]
A_19_P0080 2238	0.0230945 09	up	4,0023203	XLOC_008 925	BROAD lincRNAs version v2 (http://www.broadinstitute.org/genome_bio/human_lincrnas/)
A_33_P3240 679	0.0256723 4	up	4,0262647	BRD3	bromodomain containing 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:1104] [ENST00000371842]
A_33_P3301 331	0.0309753 38	up	4,0520806	CEACAM3	Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3), mRNA [NM_001815]

A_33_P3290	0.0195937	up	4,0592685	LOC100128402	Homo sapiens cDNA FLJ42583 fis, clone BRACE3009090. [AK124574]
A_33_P3248	0.0074735	up	4,1116266	FUT5	Homo sapiens fucosyltransferase 5 (alpha (1,3) fucosyltransferase) (FUT5), mRNA [NM_002034]
A_24_P4040	0.0158281	up	4,2087536	C15orf38	Homo sapiens chromosome 15 open reading frame 38 (C15orf38), mRNA [NM_182616]
A_19_P0033	0.0223503	up	4,209		lincRNA:chr5:139010791-139025266 reverse strand
A_19_P0032	0.0159507	up	4,262659		lincRNA:chrX:130864569-130871024 reverse strand
A_19_P0033	0.0026732	up	4,3230715		lincRNA:chr10:31600144-31607418 forward strand
A_19_P0031	0.0151123	up	4,3265443		lincRNA:chr10:4284540-4284771 reverse strand
A_32_P3066	0.0307633	up	4,4213395	FAM190A	Homo sapiens family with sequence similarity 190, member A (FAM190A), transcript variant 1, mRNA [NM_001145065]
A_19_P0032	0.0074735	up	4,426259		lincRNA:chr2:201626997-201633254 reverse strand
A_23_P3547	0.0352560	up	4,4654427	NAV2	Homo sapiens neuron navigator 2 (NAV2), transcript variant 1, mRNA [NM_182964]
A_33_P3420	0.0098746	up	4,732738		
A_19_P0032	0.0155528	up	4,761509		lincRNA:chr12:5634972-5635474 reverse strand
A_19_P0033	0.0026599	up	4,7941747		lincRNA:chr8:66501846-66512866 forward strand
A_33_P3233	0.0155528	up	4,8645606	BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic [Source:HGNC Symbol;Acc:14333] [ENST00000330955]
A_33_P3323	0.0188463	up	4,905137		
DCP_22_9	0.0023160	up	4,9177613		Unknown
A_33_P3243	0.0139060	up	5,0261908	SELV	Homo sapiens selenoprotein V (SELV), mRNA [NM_182704]
A_19_P0031	0.0435066	up	5,122225		lincRNA:chr6:22136424-22147314 reverse strand
A_33_P3402	0.0121334	up	5,1338143	CCDC8	Homo sapiens coiled-coil domain containing 8 (CCDC8), mRNA [NM_032040]
A_33_P3379	0.0181150	up	5,142578	WDR78	Homo sapiens WD repeat domain 78 (WDR78), transcript variant 2, mRNA [NM_207014]
A_33_P3299	0.0160234	up	5,1479073	KRT23	Homo sapiens keratin 23 (histone deacetylase inducible) (KRT23), mRNA [NM_015515]
A_19_P0032	0.0050431	up	5,1725874		lincRNA:chr2:224501706-224587681 reverse strand
A_33_P3832	1.3955485	up	5,2166405	SCARNA2	AGENCOURT_10609207 NIH_MGC_126 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6727460 5', mRNA sequence [BU955376]
A_32_P2002	0.0147561	up	5,230974	UCA1	Homo sapiens urothelial cancer associated 1 (non-protein coding) (UCA1), non-coding RNA [NR_015379]

A_33_P3245 650	0.0233279 95	up	5,2729597	LOC72944 4	Homo sapiens hypothetical LOC729444 (LOC729444), non-coding RNA [NR_038388]
A_33_P3338 808	0.0069789 463	up	5,361439		
A_33_P3331 178	0.0184783 82	up	5,430268		immunoglobulin heavy variable 3-16 (non-functional) [Source:HGNC Symbol;Acc:5583] [ENST00000390604]
A_33_P3325 685	0.0069789 463	up	5,575874	C18orf62	Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 62 (C18orf62), mRNA [NM_001037331]
A_33_P3559 060	0.0106576 53	up	5,7015767	PNPLA5	Homo sapiens patatin-like phospholipase domain containing 5 (PNPLA5), transcript variant 1, mRNA [NM_138814]
A_33_P3361 831	0.0072490 23	up	5,7490525	FRG2C	Homo sapiens FSHD region gene 2 family, member C (FRG2C), mRNA [NM_001124759]
A_23_P1511 33	0.0023160 765	up	5,754205	TSPAN9	Homo sapiens tetraspanin 9 (TSPAN9), transcript variant 1, mRNA [NM_006675]
A_32_P4888 18	0.0114239 45	up	5,7560143	YIPF7	Homo sapiens Yip1 domain family, member 7 (YIPF7), mRNA [NM_182592]
A_24_P6082 68	0.0301173 48	up	5,777181		immunoglobulin heavy variable 3-73 [Source:HGNC Symbol;Acc:5623] [ENST00000390636]
A_19_P0080 7979	0.0194798 4	up	5,78372		lincRNA:chr4:74389311-74400386 forward strand
DCP_22_2	1.3955485 E-4	up	5,7896147		Unknown
(+)E1A_r60_ a22	1.3955485 E-4	up	5,838997		Unknown
A_19_P0031 8597	0.0010479 502	up	5,844863		lincRNA:chr9:128910206-128911394 reverse strand
DCP_22_0	1.3955485 E-4	up	5,9113536		Unknown
A_33_P3359 878	0.0130025 85	up	5,9557033	LOC10013 2014	Homo sapiens cDNA FLJ35126 fis, clone PLACE6008285. [AK092445]
A_33_P3226 910	0.0130025 85	up	5,976032	GRK7	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase 7 (GRK7), mRNA [NM_139209]
A_33_P3281 641	0.0460116 83	up	6,0130615	OR4B1	Homo sapiens olfactory receptor, family 4, subfamily B, member 1 (OR4B1), mRNA [NM_001005470]
A_33_P3257 574	0.0381349 73	up	6,048611		Homo sapiens cDNA FLJ43016 fis, clone BRTHA2016543. [AK125006]
A_33_P3251 916	2.086596E- 4	up	6,0787654		
A_33_P3378 614	0.0085869 29	up	6,1247997	UG0898H0 9	Homo sapiens hypothetical LOC643763 (UG0898H09), non-coding RNA [NR_027378]
A_33_P3223 739	0.0018590 661	up	6,156518	OR1N1	Homo sapiens olfactory receptor, family 1, subfamily N, member 1 (OR1N1), mRNA [NM_012363]
DCP_22_4	1.3955485 E-4	up	6,241282		Unknown
A_24_P4069 39	0.0012737 976	up	6,381866	C11orf1	chromosome 11 open reading frame 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1163] [ENST00000260276]
A_19_P0080 4344	0.0069789 463	up	6,386599		lincRNA:chr1:198546652-198602677 reverse strand

A_33_P3353 330	0.0085869 29	up	6,423517		Homo sapiens cDNA FLJ40828 fis, clone TRACH2011574. [AK098147]
DCP_22_6	1.9652057 E-4	up	6,7119412		Unknown
A_23_P2387 3	0.0121334 87	up	6,7272224	PAPPA2	Homo sapiens pappalysin 2 (PAPPA2), transcript variant 1, mRNA [NM_020318]
A_19_P0081 0261	0.0272463 52	up	6,796701		lincRNA:chr10:131977935-131987135 reverse strand
DCP_22_7	2.086596E- 4	up	6,9518924		Unknown
A_23_P8938 0	0.0168226 51	up	7,0294333	SLC4A1	Homo sapiens solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) (SLC4A1), mRNA [NM_000342]
A_24_P3763 79	0.0053267 637	up	7,5779295	LOC64732 3	Homo sapiens hypothetical LOC647323 (LOC647323), non-coding RNA [NR_033944]
A_24_P2523 4	0.0069789 463	up	7,6104255	MTL5	Homo sapiens metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin) (MTL5), transcript variant 2, mRNA [NM_001039656]
A_19_P0080 3541	0.0121334 87	up	7,957494		lincRNA:chr12:1606889-1612589 reverse strand
A_24_P1227 46	0.0026599 315	up	8,006971	VWA1	Homo sapiens von Willebrand factor A domain containing 1 (VWA1), transcript variant 1, mRNA [NM_022834]
A_32_P8760 86	0.0023160 765	up	8,008517	LOC10013 0815	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100130815 (LOC100130815), miscRNA [XR_110246]
A_33_P3381 097	0.0049496 95	up	8,131124	OR10V1	Homo sapiens olfactory receptor, family 10, subfamily V, member 1 (OR10V1), mRNA [NM_001005324]
A_24_P9433 01	0.0025253 86	up	8,1448345	PEAR1	Homo sapiens platelet endothelial aggregation receptor 1 (PEAR1), mRNA [NM_001080471]
A_33_P3763 412	6.0989667 E-4	up	8,222152		Homo sapiens cDNA FLJ40109 fis, clone TESTI2007685. [AK097428]
A_23_P3506 98	0.0090385 08	up	8,922927	ANKFN1	Homo sapiens ankyrin-repeat and fibronectin type III domain containing 1 (ANKFN1), mRNA [NM_153228]
A_33_P3303 762	0.0072902 53	up	9,039632	TTC23L	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 23-like (TTC23L), mRNA [NM_144725]
A_23_P1543 38	0.0067521 78	up	9,117663	EFHD1	Homo sapiens EF-hand domain family, member D1 (EFHD1), transcript variant 1, mRNA [NM_025202]
A_23_P1432 47	0.0072112 004	up	9,182827	TSHZ2	Homo sapiens teashirt zinc finger homeobox 2 (TSHZ2), transcript variant 1, mRNA [NM_173485]
A_24_P9120 41	0.0067521 78	up	9,413696	LOC39076 0	PREDICTED: Homo sapiens protein phosphatase inhibitor 2-like (LOC390760), mRNA [XM_001715760]
A_33_P3368 083	0.0069789 463	up	9,5732	LCN8	Homo sapiens lipocalin 8 (LCN8), mRNA [NM_178469]
A_19_P0080 2181	0.0023160 765	up	9,6023445		lincRNA:chr18:35246652-35296677 reverse strand
A_19_P0080 1563	0.0027626 88	up	10,268708		lincRNA:chr2:200834655-200839730 forward strand
A_33_P3423 450	0.0023160 765	up	10,304661	LOC10013 0548	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100130548 (LOC100130548), partial miscRNA [XR_110579]
A_33_P3289 401	0.0098746 84	up	10,768191	OR52J3	Homo sapiens olfactory receptor, family 52, subfamily J, member 3 (OR52J3), mRNA [NM_001001916]

A_33_P3314 828	3.6044896 E-4	up	10,81643		
A_33_P3414 137	6.0989667 E-4	up	10,940596	GRID2IP	Homo sapiens glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2) interacting protein (GRID2IP), mRNA [NM_001145118]
A_19_P0081 0995	6.7176916 E-5	up	11,14599		lincRNA:chr2:111960680-111962218 reverse strand
A_33_P3744 736	3.3128803 E-4	up	11,24501	LOC64673 6	Homo sapiens similar to Alu subfamily SX sequence contamination warning entry, mRNA (cDNA clone IMAGE:4246459), with apparent retained intron. [BC017935]
A_33_P3294 317	6.0989667 E-4	up	11,572589		
A_19_P0031 8727	2.086596E- 4	up	12,568147	XLOC_003 303	BROAD lincRNAs version v2 (http://www.broadinstitute.org/genome_bio/human_lincrnas/)

Discussion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que des altérations de *SKIV2L* et de *TTC37*, deux gènes codant pour des protéines du complexe SKI humain, sont responsables du phénotype DS/THE. Le fait que les phénotypes des patients mutés dans l'un ou l'autre gène soient indiscernables suggère que c'est bien le déficit du complexe SKI qui est responsable des DS/THE. La mise en évidence de ces bases génétiques s'ajoute à une série de caractérisation des bases moléculaires des diarrhées graves rebelles réalisées au cours de la dernière décennie. Alors que les DS/THE ne présentent pas d'éléments paracliniques distincts, il est remarquable que les seuls signes cliniques décrits en 1994 et caractérisant cette maladie, aient permis de définir des cohortes très homogènes (celle de l'équipe de Birmingham et la nôtre) et d'aboutir à l'identification de la cause génétique.

Le complexe SKI est nécessaire à l'activité de l'exosome cytoplasmique et son altération semble entraîner une perte d'activité de l'exosome cytoplasmique (Schaeffer et coll. 2010). La perte de cette fonction est probablement partiellement compensée car le phénotype est certes sévère mais finalement compatible avec une survie. C'est le cas chez l'Homme, mais aussi chez la levure et chez *Arabidopsis thaliana*. Dans ces deux derniers modèles, les altérations phénotypiques sont finalement assez discrètes probablement en raison du fait que la voie de dégradation des ARN en 5'-3' par *XRN1* compense partiellement l'altération de l'exosome (Schaeffer et coll. 2010). Ce point semble confirmé par la létalité des doubles mutants complexes SKI/*XRN1* chez la levure (Johnson et Kolodner, 1995 et Anderson et Parker, 1998). Nous avons testé le niveau d'expression des transcrits de *XRN1* dans les cellules de patients et de témoins. Alors que nous nous attendions à

trouver une expression de *XRN1* normale voire augmentée, nous avons constaté au contraire une diminution de la production des transcrits. Ces modifications des niveaux d'expression des transcrits suggèrent une inter-régulation de l'expression des gènes du complexe SKI, voire de *XRN1*, ainsi qu'une voie de compensation qui ferait intervenir d'autres partenaires que *XRN1*. Les limites de ces tests portant sur la quantification des transcrits sont que nous analysons des cellules dans lesquelles les mécanismes de dégradation des ARNm normaux et/ou aberrants sont altérés et qu'on ne peut pas estimer dans quelle mesure, cela affecte les résultats des analyses.

Sur les 35 patients testés au sein de notre laboratoire, 10 sont porteurs de mutation de *SKIV2L* et 18 de *TTC37*, soit un rapport d'approximativement un tiers de mutation dans *SKIV2L* et 2/3 dans *TTC37*. Les 7 patients négatifs, après ré-évaluation, présentent des phénotypes incomplets et pourraient être atteints de syndromes différents. Il semble peu probable que des mutations de *WDR61* (l'orthologue de *SKI8*) soient associées au DS/THE. D'une part, tous les cas de DS/THE typiques sont expliqués par des mutations de *TTC37* ou de *SKIV2L* et les phénotypes incomplets ne présentent pas de mutation dans *WDR61*. D'autre part, *WDR61* étant un co-facteur du complexe PAF chez l'Homme et Arabidopsis, il possède donc d'autres fonctions que celle de co-facteur du complexe SKI (Zhu et coll. 2005, Dorcey et coll. 2012). On peut donc s'attendre à ce qu'une éventuelle altération de ce gène produise un phénotype différent. D'ailleurs les souches d'Arabidopsis déficitaires pour l'orthologue de *SKI8* ont un phénotype plus complexe que celles qui sont déficitaires pour l'orthologue de *SKI2*, associant des anomalies de la taille mais également du bourgeonnement (Dorcey et coll. 2012).

Compte tenu de la conservation de la séquence des protéines de l'exosome et du complexe SKI, nous pouvons supposer que ces fonctions sont conservées chez les eucaryotes (Sloan et coll. 2012). Les phénotypes des patients atteints de DS/THE présentent un certain degré de variabilité portant sur la nature des signes cliniques et leur gravité. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de faire de corrélation génotype/phénotype, que ce soit entre les patients mutés dans *TTC37* et *SKI/2L* ou entre ceux mutés dans un même gène avec des mutations de localisation et de nature différentes. Il est de même, difficile d'estimer si c'est la perturbation globale des activités de l'exosome cytoplasmique qui est responsable du phénotype ou seulement celle de certaines fonctions (Klauer et Van Hoof, 2012). Il semble qu'une partie des ARNm, notamment ceux qui ne possèdent pas de codon STOP, sont quand même traduits en protéine, induisant potentiellement des dysfonctionnements de la cellule (Izawa et coll. 2012). Un des traits caractéristiques des DS/THE est que les organes affectés sont majoritairement ceux avec un renouvellement cellulaire rapide (tube digestif, peau, cellules hématopoïétiques, foie), et donc ceux qui présentent probablement un taux de transcription élevé. Dans ces tissus, il pourrait donc exister une augmentation globale des ARNm normaux et/ou aberrants qui donnerait lieu à des peptides aberrants et impacterait le fonctionnement général de la cellule.

La majorité des patients ayant une DS/THE présentent un retard de croissance intra-utérin et conservent une petite taille en dépit d'une nutrition optimale. Cela est à mettre en parallèle avec le phénotype observé chez *Arabidopsis thaliana*, chez qui des altérations des orthologues de *SKI2* et de *SKI8* donnent un phénotype « nain ».

La diarrhée qui est plus variable dans sa gravité et sa date de survenue (des premiers jours de vie jusqu'à quelques mois) pourrait être provoquée par des altérations des fonctions contrôlant les interactions avec la flore intestinale. Deux aspects de cette fonction peuvent être perturbés : les mécanismes de tolérance à la flore saprophyte ou les mécanismes de l'immunité innée et notamment les mécanismes anti-viraux. Cet aspect du phénotype pourrait être exploré par la détermination du microbiote des patients qu'il est maintenant possible d'étudier par des techniques de séquençage à haut débit. Le microbiote humain normal comprend plusieurs centaines d'espèces réparties en 5 groupes. Il serait intéressant de voir si les aspects quantitatifs et qualitatifs sont modifiés chez les patients. Il est à noter que la nutrition parentérale doit, en elle-même, très probablement induire des modifications de la flore intestinale.

Le fait que certains patients nécessitent une nutrition parentérale prolongée alors que d'autres, même avec une diarrhée chronique, ne requièrent qu'une nutrition entérale est dû, soit à une certaine variabilité phénotypique, soit à un biais lié aux différences d'indications de la nutrition parentérale suivant les pays.

Les mécanismes conduisant aux anomalies des cheveux spécifiques de ce syndrome, sont également peu connus. La composition des cheveux montre une diminution nette en AA sulfurés (cystine, serine et proline), alors que la proportion d'aspartate, de glutamate et de la leucine est augmentée (Hartley et coll. 2010). Ces modifications sont semblables à celles observées dans la Trichothiodystrophie. Cette maladie autosomique, récessive, multi-systémique comprenant des atteintes neurologique, dermatologique, gonadique et un retard de croissance, est génétiquement hétérogène. Elle est causée par des altérations des gènes *XPB*, *XPD* ou *TTDA* impliqués dans la réparation de l'ADN ou par des anomalies de *TTDN1* de

fonction inconnue (Faghri et coll. 2008). Les anomalies constitutionnelles de *XPD* (hélicase à ADN) sont par ailleurs responsables de 2 autres syndromes : le syndrome de Cockaine et le xeroderma pigmentosum (Wolsky et coll 2010). Le phénotype n'est que partiellement chevauchant avec les DS/THE et il n'y a pas d'interaction connue entre ces gènes et le complexe SKI. Dans le cas de la Trichothiodystrophie, la cause de l'atteinte des cheveux est également inconnue.

L'aspect immunitaire est également mal compris. D'une part, le phénotype biologique n'est pas bien caractérisé, les traits les plus constants étant des anomalies de production des immunoglobulines et un défaut de réponse aux antigènes vaccinaux. On peut noter que, dans la cohorte française, environ un tiers des patients a présenté un syndrome d'activation macrophagique (SAM) post infectieux. Le SAM est une stimulation inappropriée des cellules macrophagiques dans la moelle osseuse et le système lymphoïde, qui entraîne une phagocytose anormale des éléments figurés du sang (Karras et Hermine 2002). Les SAM peuvent être primaires ou secondaires à des infections, à des syndromes néoplasiques ou à des maladies auto-immunes. Les SAM post-infectieux sont dans la moitié des cas secondaires à des infections à virus Herpes (Herpes, varicelle, zona), quelques cas ont été rapportés dans la littérature dans les suites d'une nutrition parentérale mais la proportion de SAM dans notre cohorte semble particulièrement élevée. Une des 15 patients de la cohorte française est décédée à 18 ans des complications d'une rougeole. Tous ces éléments suggèrent une perturbation immunitaire concernant à la fois l'immunité acquise et l'immunité innée avec potentiellement une perturbation importante des mécanismes anti-viraux.

Concernant le rôle du complexe SKI et de l'exosome dans le déficit immunitaire, l'aspect antiviral du complexe SKI est documenté chez la levure

(Scheffer et coll. 2010) mais sa participation à l'immunité innée chez l'homme n'est pour l'instant pas démontrée. Concernant l'immunité acquise, une étude a montré que l'exosome nucléaire était nécessaire à l'activation de la déaminase cytidine induite, enzyme participant à la génération de la diversité des immunoglobulines par les mutations hypersomatiques (Basu et coll. 2011). On peut supposer que des perturbations de l'exosome cytoplasmique pourraient affecter la dégradation des ARNm codant pour les chaînes variables des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T.

Compte tenu de la symptomatologie hépatique, il paraît étonnant que *TTC37* ne soit pas très exprimé dans le foie. L'atteinte hépatique précédant parfois la mise sous nutrition parentérale, il semble que ce soit bien les anomalies de *TTC37* ou de *SKIV2L* qui soient responsables de cette atteinte et non pas uniquement les effets indésirables de la nutrition parentérale.

La compréhension des mécanismes précis par lesquels une anomalie du complexe SKI et donc de l'exosome cytoplasmique est responsable des signes cliniques est encore à découvrir. Il est probable que ces progrès passeront par la conception et l'étude de modèle animaux. L'équipe du Pr. Royet de l'IBDML à Marseille a créé par mutagenèse une lignée de drosophiles mutées dans *CG8777*, l'orthologue de *TTC37*. Ce modèle est encore en cours de caractérisation mais, des résultats préliminaires ont mis en évidence une majoration du nombre de selles et une majoration des pertes en eau chez ces drosophiles mutantes. Cette équipe a également pu caractériser l'existence chez une drosophile mutante en *SMG5* (gène codant pour une protéine impliquée également dans la dégradation des ARNm défectueux) un tableau identique bien que moins sévère. Ce modèle de drosophile reproduit donc un des signes majeurs des DS/THE et semble bien indiquer que la

diarrhée est liée au défaut de dégradation des ARN. La poursuite de la caractérisation permettra de savoir si d'autres signes, notamment le nanisme, sont retrouvés dans ce modèle. Toutefois, l'absence de système immunitaire adaptatif chez la *Drosophile* limite les comparaisons avec l'Homme. De ce fait, la création d'un modèle murin semble nécessaire afin de pouvoir mieux caractériser les conséquences des défauts du complexe SKI et éventuellement de tester des approches thérapeutiques. Cela passera par la création de modèles KO de *TTC37* et *SKI/2L* et si possible de *WDR61* et *HBS1*.

Le complexe SKI est finalement assez peu connu que ce soit chez l'Homme ou la levure, notamment son articulation avec l'exosome. Si quelques travaux sont publiés sur le rôle de MTR4 et des cofacteurs nucléaires (par exemple Wang et coll. 2008, Bernstein et coll. 2008, Jia et coll. 2011, Jia et coll. 2012), le rôle du complexe SKI, son recrutement et sa fonction sont moins documentés. Par exemple, on ne sait pas si le complexe SKI peut interagir directement avec l'exosome ou uniquement par le biais de SKI7 ou encore par l'intermédiaire de DIS3 ou de Rrp6 (Lebreton et Seraphin 2008, Wang et coll. 2005, Araki et coll 2001). Le fait que le phénotype *superkiller* soit retrouvé également en présence d'altérations de 2 protéines de l'exosome : Csl4 et Rrp41, pourrait suggérer que tout ou partie des interactions de l'exosome et du complexe SKI est assuré par ces sous unités. Par ailleurs, se pose le problème de l'absence d'orthologue de SKI7 chez la majorité des eucaryotes. En effet, chez la plupart des eucaryotes, et notamment chez les mammifères, on n'a pas formellement identifié d'orthologue de SKI7, l'hypothèse étant que HBS1, paralogue de SKI7 chez la levure et présent chez les eucaryotes, assurerait les fonctions de SKI7. Or, étant donné que c'est l'extrémité N-terminale de SKI7 qui est responsable

des interactions avec le complexe SKI et l'exosome, et que c'est une région non conservée chez les orthologues de HBS1 des eucaryotes, cela paraît peu probable. L'exosome présente une taille relativement faible (2538 AA au total pour les 9 unités) par rapport au complexe SKI (3420 AA) ou par rapport à DIS3 (958 AA) et Rrp6 (885 AA). Compte tenu de la conservation du complexe SKI, de la taille importante de ce dernier et du fait que SKI3 et SKI8 sont des protéines structurellement impliquées dans les interactions protéines-protéines, il semble licite de penser que le complexe SKI assure des fonctions clés dans la régulation de l'activité de l'exosome cytoplasmique, possiblement en interagissant avec d'autres protéines.

Enfin, il faut évoquer le modèle de « l'exozyme » proposé par Kiss et Andrulis en 2011. Pour ces derniers, à côté de l'exosome « classique », les composants de l'exosome pourraient former des complexes fonctionnels plus petits avec seulement quelques protéines et qui assureraient des fonctions plus ciblées. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi seules TTC37 et SKIV2L sont impliquées dans le syndrome DS/THE par le fait qu'elles formeraient à elles deux un complexe plus petit, assurant une fonction bien spécifique. Cependant, le fait que le canal central de l'exosome semble essentiel à la modulation des activités ribonucléasiques et ne peut pas être présent sur ces petits complexes semble contredire ce modèle au moins chez la levure (Wasmuth et Lima 2012).

L'exosome est présent chez les archées mais certaines d'entre elles semblent avoir perdu tout ou partie de l'exosome au cours de l'évolution (Koonin et coll. 2001, Gribaldo et Brochiet-Armanet 2006). Par ailleurs, chez les archées, l'exosome présente une activité endo et exonucléasique alors que cette activité est assurée par des co-facteurs (Dis3 et Rrp6) chez les eucaryotes (Whitarana et coll 2012, Matos et coll 2012).

L'exosome des eucaryotes comporte une hélicase à ARN comme cofacteur que ce soit dans le cytoplasme et dans le noyau, alors que cette activité ne semble pas exister chez les archées. Ceci suggère que les hélicases associées à l'exosome et le complexe SKI ne sont apparues qu'après la divergence entre les archées et les eucaryotes. Compte tenu des similitudes des caractéristiques structurales de MTR4 et de SKI2, on peut supposer qu'il s'agissait initialement de deux paralogues s'étant secondairement spécialisés. Le fait que les trypanosomes ne possèdent qu'un orthologue de Mtr4 (TbMtr4) et pas d'orthologue des constituants du complexe SKI peut être interprété comme un trait primitif ou une perte secondaire (Cristodero et Clayton, 2007). Cependant, le fait que TbMTR4 soit associé au complexe TRAMP et possède une localisation nucléaire alors que l'exosome des trypanosomes est également cytoplasmique fait plutôt évoquer une perte secondaire (Haile et coll. 2007, Etheridge et coll, 2008).

En conclusion, nous avons contribué à la découverte des bases moléculaires des DS/THE et ouvert ainsi des pistes pour la caractérisation des fonctions de l'exosome et de ses co-facteurs chez l'Homme. Cependant, des données plus complètes sur le rôle du complexe SKI chez l'Homme devront être obtenues pour mieux comprendre cette pathologie et à terme améliorer la prise en charge des patients.

Références

- Alderuccio F, Chan EK, Tan EM. Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in the polymyositis/scleroderma overlap syndrome: a unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kD acidic protein of the nucleolar complex. *J Exp Med*. 1991 Apr 1;173(4):941-52.
- Allan RK, Ratajczak T. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones*. 2011 Jul;16(4):353-67
- Allanore Y, Avouac J, Kahan A. Systemic sclerosis: an update in 2008. *Joint Bone Spine*. 2008 Dec;75(6):650-5.
- Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D, Mitchell P. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev*. 1999 Aug 15;13(16):2148-58.
- Anderson JS, Parker RP. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J*. 1998 Mar 2;17(5):1497-506.
- Araki Y, Takahashi S, Kobayashi T, Kajihō H, Hoshino S, Katada T. Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3' to 5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* 2001; 20(17):4684-93.
- Arora C, *et al.* (2004) Antiviral protein Ski8 is a direct partner of Spo11 in meiotic DNA break formation, independent of its cytoplasmic role in RNA metabolism. *Mol Cell* 13(4):549-59
- Astuti D, Morris MR, Cooper WN, Staals RH, Wake NC, Fews GA, Gill H, Gentle D, Shuib S, Ricketts CJ, Cole T, van Essen AJ, van Lingen RA, Neri G, Opitz JM, Rump P, Stolte-Dijkstra I, Müller F, Puijn GJ, Latif F, Maher ER. Germline mutations in DIS3L2 cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nat Genet*. 2012 Feb 5;44(3):277-84.
- Barabino AV, Torrente F, Castellano E, Erba D, Calvi A, Gandullia P. "Syndromic diarrhea" may have better outcome than previously reported. *J Pediatr*. 2004 Apr;144(4):553-4. Erratum in: *J Pediatr*. 2004 Jun;144(6):838. Torrenti F

- Basu U, Meng FL, Keim C, Grinstein V, Pefanis E, Eccleston J, Zhang T, Myers D, Wasserman CR, Wesemann DR, Januszyk K, Gregory RI, Deng H, Lima CD, Alt FW. The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell*. 2011 Feb 4;144(3):353-63.
- Bernstein J, Patterson DN, Wilson GM, Toth EA (2008) Characterization of the essential activities of *Saccharomyces cerevisiae* Mtr4p, a 3'→5' helicase partner of the nuclear exosome. *J Biol Chem* 283:4930–4942.
- Berry EA, Bevan EA. A new species of double-stranded RNA from yeast. *Nature*. 1972 Sep 29;239(5370):279-80
- Bhutta ZA, Ghishan F, Lindley K, Memon IA, Mittal S, Rhoads JM; Commonwealth Association of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Persistent and chronic diarrhea and malabsorption: Working Group report of the second World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Jun;39 Suppl 2:S711-6.
- Blüthner M, Bautz FA. Cloning and characterization of the cDNA coding for a polymyositis-scleroderma overlap syndrome-related nucleolar 100-kD protein. *Exp Med*. 1992 Oct 1;176(4):973-80.
- Bonnemains C, Berthelot J, Mousson de Camaret B, Chomienne F, Duveau E, Giniès JL. Cytopathie mitochondriale : une cause inhabituelle d'atrophie villositaire totale chez le nourrisson. *Arch Pediatr*. 2004 Feb;11(2):118-21.
- Bozzetti V, Bovo G, Vanzati A, Roggero P, Tagliabue P E. A New Genetic Mutation in a Patient with Syndromic Diarrhea and Hepatoblastoma. *JPGN* September 20, 2012 - Volume Publish Ahead of Print
- Brown JT, Bai X, Johnson AW. The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA*. 2000 Mar;6(3):449-57.
- Buttner, K., Wenig, K. and Hopfner, K. P. (2005). Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in RNA processing. *Mol. Cell* 20, 61-471.
- Callen JP. Dermatomyositis. *Lancet*. 2000 Jan 1;355(9197):53-7.
- Canani BR, Terrin G, Cardillo G, Tomaiuolo R, Castaldo G. Congenital diarrheal disorders: improved understanding of gene defects is leading to advances in intestinal physiology and clinical management. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Apr;50(4):360-6.

- Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;119(2):482-7.
- Chlebowski A, Tomecki R, López ME, Séraphin B, Dziembowski A. Catalytic properties of the eukaryotic exosome. *Adv Exp Med Biol*. 2010;702:63-78
- Chung HJ, Uitto J. Epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Dermatol Clin*. 2010 Jan;28(1):43-54.
- Colomb V, Dabbas-Tyan M, Taupin P, Talbotec C, Révillon Y, Jan D, De Potter S, Gorski-Colin AM, Lamor M, Herreman K, Corriol O, Landais P, Ricour C, Goulet O. Long-term outcome of children receiving home parenteral nutrition: a 20-year single-center experience in 302 patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Mar;44(3):347-53
- Crevel G, Bennett D, Cotterill S. The human TPR protein TTC4 is a putative Hsp90 co-chaperone which interacts with CDC6 and shows alterations in transformed cells. *PLoS One*. 2008 Mar 5;3(3):e0001737.
- Cristodero M, Clayton CE. Trypanosome MTR4 is involved in rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(20):702330.
- Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*. 2003 Sep 20;362(9388):971-82.
- D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*. 2003 Dec;28(12):655-62.
- de Lonlay P, Seta N. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1792(9):841-3.
- de Vries E, Visser DM, van Dongen JJ, Jacobs CJ, Hoekstra JH, van Tol MJ. Oligoclonal gammopathy in phenotypic diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Mar;30(3):349-50.
- Decker CJ, Parker R. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev*. 1993 Aug;7(8):1632-43..
- Doma MK, Parker R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature*. 2006 Mar 23;440(7083):561-4.

- Dorcey E, Rodriguez-Villalon A, Salinas P, Santuari L, Pradervand S, Harshman K, Hardtke CS. Context-dependent dual role of SKI8 homologs in mRNA synthesis and turnover. *PLoS Genet*. 2012;8(4):e1002652.
- Dweikat I, Sultan M, Maraqa N, Hindi T, Abu-Rmeileh S, Abu-Libdeh B. Tricho-hepato-enteric syndrome: a case of hemochromatosis with intractable diarrhea, dysmorphic features, and hair abnormality. *Am J Med Genet A*. 2007 Mar 15;143(6):581-3.
- Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Séraphin B. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Jan;14(1):15-22.
- Eberle AB, Lykke-Andersen S, Mühlemann O, Jensen TH. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Jan;16(1):49-55.
- Egritas O, Dalgic B, Onder M. Tricho-hepato-enteric syndrome presenting with mild colitis. *Eur J Pediatr*. 2009 Aug;168(8):933-5.
- Etheridge RD, Clemens DM, Gershon PD, Aphasizhev R. Identification and characterization of nuclear non-canonical poly(A) polymerases from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Mar;164(1):66-73.
- Evguenieva-Hackenberg E. The archaeal exosome. *Adv Exp Med Biol*. 2011;702:29-38.
- Fabre A, André N, Breton A, Broué P, Badens C, Roquelaure B. Intractable diarrhea with "phenotypic anomalies" and tricho-hepato-enteric syndrome: two names for the same disorder. *Am J Med Genet A*. 2007 Mar 15;143(6):584-8.
- Fabre A, Martinez-Vinson C, Roquelaure B, Missirian C, André N, Breton A, Lachaux A, Odul E, Colomb V, Lemale J, Cézard JP, Goulet O, Sarles J, Levy N, Badens C. Novel mutations in TTC37 associated with tricho-hepato-enteric syndrome. *Hum Mutat*. 2011 Mar;32(3):277-81.
- Fabre A, Roquelaure B, Lacoste C, André N, Sarles J, Breton A, Martinez-Vinson C, Cezard JP, Colomb V, Goulet O, Levy N, Badens C. Exclusion of EGFR, HRAS, DSP, JUP, CTNNB1, PLEC1, and EPPK1 as functional candidate genes in 7 families with syndromic diarrhoea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Apr;48(4):501-3.

- Faghri S, Tamura D, Kraemer KH, Digiovanna JJ. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J Med Genet.* 2008 Oct;45(10):609-21. Epub 2008 Jun 25.
- Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol.* 2010 Jun;20(3):313-24.
- Fang F, Hoskins J, Butler JS. 5-fluorouracil enhances exosome-dependent accumulation of polyadenylated rRNAs. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10766-76.
- Farooqi, I. S., Volders, K., Stanhope, R., Heuschkel, R., White, A., Lank, E., Keogh, J., O'Rahilly, S., Creemers, J. W. M. Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J. Clin. Endocr. Metab.* 92: 3369-3373, 2007
- Girault D, Goulet O, Le Deist F, Brousse N, Colomb V, Césarini JP, de Potter S, Canioni D, Griscelli C, Fischer A, et al. Intractable infant diarrhea associated with phenotypic abnormalities and immunodeficiency. *J Pediatr.* 1994 Jul;125(1):36-42.
- Goulet O, Salomon J, Ruemmele F, de Serres NP, Brousse N. Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J Rare Dis.* 2007 Apr 20;2:20.
- Goulet O, Vinson C, Roquelaure B, Brousse N, Bodemer C, Cézard JP. Syndromic(phenotypic) diarrhea in early infancy. *Orphanet J Rare Dis.* 2008 Feb 28;3:6.
- Goulet O. Diarrhées graves rebelles du nourrisson *Arch Pediatr.* 2001 May;8 Suppl 2:399s-402s.
- Goulet O., Phillips AD. Congenital enteropathies. In Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease. BC Decker Inc Hamilton 2008. 309-18.
- Goulet OJ, Brousse N, Canioni D, Walker-Smith JA, Schmitz J, Phillips AD. Syndrome of intractable diarrhoea with persistent villous atrophy in early childhood: a clinicopathological survey of 47 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998 Feb;26(2):151-61

- Gribaldo S, Brochier-Armanet C. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Jun 29;361(1470):1007-22.
- Gudipati RK, Xu Z, Lebreton A, Séraphin B, Steinmetz LM, Jacquier A, Libri D. Extensive Degradation of RNA Precursors by the Exosome in Wild-Type Cells. *Mol Cell.* 2012 Sep 19. pii: S1097-2765(12)00736-8.
- Haile S, Cristodero M, Clayton C, Estévez AM. The subcellular localisation of trypanosome RRP6 and its association with the exosome. *Mol Biochem Parasitol.* 2007 Jan;151(1):52-8..
- Halbach F, Rode M, Conti E. The crystal structure of *S. cerevisiae* Ski2, a DExH helicase associated with the cytoplasmic functions of the exosome. *RNA.* 2012 Jan;18(1):124-34.
- Hannibal MC, Torgerson T. IPEX Syndrome. 2004 Oct 19 [Updated 2011 Jan 27]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1118/>
- Hartley JL, Zachos NC, Dawood B, Donowitz M, Forman J, Pollitt RJ, Morgan NV, Tee L, Gissen P, Kahr WH, Knisely AS, Watson S, Chitayat D, Booth IW, Protheroe S, Murphy S, de Vries E, Kelly DA, Maher ER. Mutations in TTC37 cause trichohepatoenteric syndrome (phenotypic diarrhea of infancy). *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(7):2388-98, 2398.e1-2.
- Heinz-Erian P, Müller T, Krabichler B, Schranz M, Becker C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Rossier B, Vujic M, Booth IW, Holmberg C, Wijmenga C, Grigelioniene G, Kneepkens CM, Rosipal S, Mistrik M, Kappler M, Michaud L, Dóczy LC, Siu VM, Krantz M, Zoller H, Utermann G, Janecke AR. Mutations in SPINT2 cause a syndromic form of congenital sodium diarrhea. *Am J Hum Genet.* 2009 Feb;84(2):188-96.
- Horn XB, Lavine JE. Gastrointestinal complications of mitochondrial disease. *Mitochondrion* 4 (2004) 601–607
- Hougan L, Thomas DY, Whiteway M. Cloning and characterization of the SKI3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* demonstrates allelism to SKI5. *Curr Genet.* 1989 Sep;16(3):139-43.

- Hu W, Petzold C, Collier J, Baker KE. Nonsense-mediated mRNA decapping occurs on polyribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Feb;17(2):244-7.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 2003 Oct 16;425(6959):686-91.
- Huntzinger E, Kashima I, Fauser M, Saulière J, Izaurralde E. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA*. 2008 Dec;14(12):2609-17.
- Izawa T, Tsuboi T, Kuroha K, Inada T, Nishikawa S, Endo T. Roles of dom34:hbs1 in nonstop protein clearance from translocators for normal organelle protein influx. *Cell Rep*. 2012 Sep 27;2(3):447-53.
- Jackson RN, Klauer AA, Hintze BJ, Robinson H, van Hoof A, Johnson SJ. The crystal structure of Mtr4 reveals a novel arch domain required for rRNA processing. *EMBO J*. 2010 Jul 7;29(13):2205-16.
- Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ, Holst JJ, Brubaker PL, Corvol P, Polonsky KS, Ostrega D, Becker KL, Bertagna X, Hutton JC, White A, Dattani MT, Hussain K, Middleton SJ, Nicole TM, Milla PJ, Lindley KJ, O'Rahilly S. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1550-60.
- Jackson, R. S., Creemers, J. W. M., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.-L., Sanders, L., Montague, C. T., Hutton, J. C., O'Rahilly, S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nature Genet*. 16: 303-306, 1997.
- Januszyk K, Lima CD. Structural components and architectures of RNA exosomes. *Adv Exp Med Biol*. 2010;702:9-28.
- Jia H, Wang X, Anderson JT, Jankowsky E. RNA unwinding by the Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8;109(19):7292-7.
- Jia H, Wang X, Liu F, Guenther UP, Srinivasan S, Anderson JT, Jankowsky E. The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell*. 2011 Jun 10;145(6):890-901.

- Johnson AW, Kolodner RD. Synthetic lethality of sep1 (xrn1) ski2 and sep1 (xrn1) ski3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of killer virus and suggests a general role for these genes in translation control. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2719-27.
- Johnson SJ, Jackson RN. Ski2-like RNA helicase structures: Common themes and complex assemblies. *RNA Biol.* 2012 Sep 20;10(1).
- Jolivet, S.; Vezon, D.; Froger, N.; Mercier, R. Non conservation of the meiotic function of the ski8/Rec103 homolog in *Arabidopsis*. *Genes Cells* **2006**, *11*, 615–622.
- Karras A, Hermine O. **Syndrome d'activation macrophagique** *Rev Med Interne.* 2002 Sep;23(9):768-78.
- Kiss DL, Andrulis ED. The exozyme model: a continuum of functionally distinct complexes. *RNA.* 2011 Jan;17(1):1-13.
- Klauer AA, van Hoof A. Degradation of mRNAs that lack a stop codon: a decade of nonstop progress. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012 Sep;3(5):649-60.
- Knafelz D, Gambarara M, Diamanti A, Papadatou B, Ferretti F, Tarissi De Iacobis I, Castro M. Complications of home parenteral nutrition in a large pediatric series. *Transplant Proc.* 2003 Dec;35(8):3050-1.
- Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R; Parenteral Nutrition Guidelines Working Group; European Society for Clinical Nutrition and Metabolism; European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN); European Society of Paediatric Research (ESPR). 1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Nov;41 Suppl 2:S1-87.
- Koonin EV, Wolf YI, Aravind L. Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome Res.* 2001 Feb;11(2):240-52.

- Kopplin LJ, Igo RP Jr, Wang Y, Sivakumaran TA, Hagstrom SA, Peachey NS, Francis PJ, Klein ML, SanGiovanni JP, Chew EY, Pauer GJ, Sturgill GM, Joshi T, Tian L, Xi Q, Henning AK, Lee KE, Klein R, Klein BE, Iyengar SK. Genome-wide association identifies SKIV2L and MYRIP as protective factors for age related macular degeneration. *Genes Immun.* 2010 Dec;11(8):609-21.
- Kumar R. de Massy B. Initiation of Meiotic Recombination in Mammals. *Genes* 2010, 1, 521-549;
- Lachaux A, Bouvier R, Loras-Duclaux I, Chappuis JP, Meneguzzi G, Ortonne JP. Isolated deficient alpha6beta4 integrin expression in the gut associated with intractable diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999 Oct;29(4):395-401.
- Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci.* 1995 Jul;20(7):257-9.
- Landers MC, Schroeder TL. Intractable diarrhea of infancy with facial dysmorphism, trichorrhexis nodosa, and cirrhosis. *Pediatr Dermatol.* 2003 Sep-Oct;20(5):432-5.
- Lange H, Sement FM, Gagliardi D. MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2011 Oct;68(1):51-63
- Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009 Jan;41(1):112-7
- Liu, Q., Greimann, J. C. and Lima, C. D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127, 1223-1237.
- Lykke-Andersen S, Brodersen DE, Jensen TH. Origins and activities of the eukaryotic exosome. *J Cell Sci.* 2009 May 15;122(Pt 10):1487-94.
- Lykke-Andersen S, Tomecki R, Jensen TH, Dziembowski A. The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biol.* 2011 Jan-Feb;8(1):61-6.

- Martin MG, Wright EM. Congenital Intestinal Transport Defect. In Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease. BC Decker Inc Hamilton 2008. 289-308
- Martinez-Vinson MC. Les diarrhées graves syndromiques. Thèse d'exercice de médecine. Université Paris Diderot-Paris 7. 2004
- Masison DC, Blanc A, Ribas JC, Carroll K, Sonenberg N, Wickner RB. Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2763-71.
- Matos RG, López-Viñas E, Gómez-Puertas P, Arraiano CM. The only exoribonuclease present in *Haloferax volcanii* has a unique response to temperature changes. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Oct;1820(10):1543-52.
- Matsumoto Y, Sarkar G, Sommer SS, Wickner RB. A yeast antiviral protein, SKI8, shares a repeated amino acid sequence pattern with beta-subunits of G proteins and several other proteins. *Yeast.* 1993 Jan;9(1):43-51.
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995;376:337–41.
- Moon SL, Barnhart MD, Wilusz J. Inhibition and avoidance of mRNA degradation by RNA viruses. *Curr Opin Microbiol.* 2012 Aug;15(4):500-5.
- Muhlrads D, Parker R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature.* 1994 Aug 18;370(6490):578-81.
- Müller T, Hess MW, Schiefermeier N, Pfaller K, Ebner HL, Heinz-Erian P, Ponstingl H, Partsch J, Röllinghoff B, Köhler H, Berger T, Lenhartz H, Schlenck B, Houwen RJ, Taylor CJ, Zoller H, Lechner S, Goulet O, Utermann G, Ruemmele FM, Huber LA, Janecke AR. MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity. *Nat Genet.* 2008 Oct;40(10):1163-5
- Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A. Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr.* 2009 Mar;168(3):297-302.
- Murch SH, Winyard PJ, Koletzko S, Wehner B, Cheema HA, Risdon RA, Phillips AD, Meadows N, Klein NJ, Walker-Smith JA. Congenital enterocyte

heparan sulphate deficiency with massive albumin loss, secretory diarrhoea, and malnutrition. *Lancet*. 1996 May 11;347(9011):1299-301.

- Murch SH. Toward a molecular understanding of complex childhood enteropathies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002 May-Jun;34 Suppl 1:S4-10.
- Orban TI, Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*. 2005 Apr;11(4):459-69.
- Passariello A, Terrin G, Baldassarre ME, De Curtis M, Paludetto R, Berni Canani R. Diarrhea in neonatal intensive care unit. *World J Gastroenterol*. 2010 Jun 7;16(21):2664-8.
- Qu X, Yang Z, Zhang S, Shen L, Dangel AW, Hughes JH, Redman KL, Wu LC, Yu CY. The human DEVH-box protein Ski2w from the HLA is localized in nucleoli and ribosomes. *Nucleic Acids Res*. 1998 Sep 1;26(17):4068-77
- Reichlin M, Maddison PJ, Targoff I, Bunch T, Arnett F, Sharp G, Treadwell E, Tan EM. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. *J Clin Immunol*. 1984 Jan;4(1):40-4.
- Reimer G, Scheer U, Peters JM, Tan EM. Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. *J Immunol*. 1986 Dec 15;137(12):3802-8.
- Rhee SK, Icho T, Wickner RB. Structure and nuclear localization signal of the SKI3 antiviral protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1989 May-Jun;5(3):149-58.
- Ridley SP, Sommer SS, Wickner RB. Superkiller mutations in *Saccharomyces cerevisiae* suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and L-A-HN. *Mol Cell Biol*. 1984 Apr;4(4):761-70.
- Rubio-Cabezas O, Jensen JN, Hodgson MI, Codner E, Ellard S, Serup P, Hattersley AT. Permanent Neonatal Diabetes and Enteric Anendocrinosis Associated With Biallelic Mutations in *NEUROG3*. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1349-53.
- Ruemmele F, Brousse N, Goulet O. Autoimmune Enteropathy and IPEX syndrome. In *Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease*. BC Decker Inc Hamilton 2008. 339-44

- Ruemmele FM, Schmitz J, Goulet O. Microvillous inclusion disease (microvillous atrophy). *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Jun 26;1:22
- Salomon J, Espinosa-Parrilla Y, Goulet O, Al-Qabandi W, Guigue P, Canioni D, Bruneau J, Alzahrani F, Almuhsen S, Cerf-Bensussan N, Jeanpierre M, Brousse N, Lyonnet S, Munnich A, Smahi A. A founder effect at the EPCAM locus in Congenital Tufting Enteropathy in the Arabic Gulf. *Eur J Med Genet.* 2011 May-Jun;54(3):319-22.
- Salvestrini C, McGrath JA, Ozoemena L, Husain K, Buhamrah E, Sabery N, Leichtner A, Rufo PA, Perez-Atayde A, Orteu CH, Torrente F, Heuschkel RB, Thomson MA, Murch SH. Desquamative enteropathy and pyloric atresia without skin disease caused by a novel intracellular beta4 integrin mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Nov;47(5):585-91.
- Schaeffer D, Clark A, Klauer AA, Tsanova B, van Hoof A. Functions of the cytoplasmic exosome. *Adv Exp Med Biol.* 2011;702:79-90.
- Schmitt MJ, Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.* 2002 Aug;26(3):257-76.
- Schneider C, Leung E, Brown J, Tollervey D. The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res.* 2009 Mar;37(4):1127-400.
- Shoemaker CJ, Eyler DE, Green R. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science.* 2010 Oct 15;330(6002):369-72.
- Sivagnanam M, Mueller JL, Lee H, Chen Z, Nelson SF, Turner D, Zlotkin SH, Pencharz PB, Ngan BY, Libiger O, Schork NJ, Lavine JE, Taylor S, Newbury RO, Kolodner RD, Hoffman HM. Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology.* 2008 Aug;135(2):429-37.
- Sloan KE, Schneider C, Watkins NJ. Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug;40(4):850-5.
- Spencer CT, Compher C. The development of TPN: an interview with pioneer surgical nutritionist Jonathan E. Rhoads, MD. *J Am Diet Assoc* 2001;101:747–50.
- Staals RH, Pruijn GJ. The human exosome and disease. *Adv Exp Med Biol.* 2010;702:132-42.

- Stankler L, Lloyd D, Pollitt RJ, Gray ES, Thom H, Russell G. Unexplained diarrhoea and failure to thrive in 2 siblings with unusual facies and abnormal scalp hair shafts: a new syndrome. *Arch Dis Child*. 1982 Mar;57(3):212-6.
- Synowsky SA, Heck AJ. The yeast Ski complex is a hetero-tetramer. *Protein Sci*. 2008 Jan;17(1):119-25.
- Toh-E A, Guerry P, Wickner RB. Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1978 Dec;136(3):1002-7.
- Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepień, P.P. et al. (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J*. 29, 2342–2357
- Tsuboi T, Kuroha K, Kudo K, Makino S, Inoue E, Kashima I, Inada T. Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell*. 2012 May 25;46(4):518-29.
- van Hoof A. Conserved functions of yeast genes support the duplication, degeneration and complementation model for gene duplication. *Genetics* 2005; 171(4):1455-61.
- Verloes A, Lombet J, Lambert Y, Hubert AF, Deprez M, Fridman V, Gosseye S, Rigo J, Sokal E. Tricho-hepato-enteric syndrome: further delineation of a distinct syndrome with neonatal hemochromatosis phenotype, intractable diarrhea, and hair anomalies. *Am J Med Genet*. 1997 Feb 11;68(4):391-5.
- Vodkin M, Katterman F, Fink GR. Yeast killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acid. *J Bacteriol*. 1974 Feb;117(2):681-6.
- Wan J, Yourshaw M, Mamsa H, Rudnik-Schöneborn S, Menezes MP, Hong JE, Leong DW, Senderek J, Salman MS, Chitayat D, Seeman P, von Moers A, Graul-Neumann L, Kornberg AJ, Castro-Gago M, Sobrido MJ, Sanefuji M, Shieh PB, Salamon N, Kim RC, Vinters HV, Chen Z, Zerres K, Ryan MM, Nelson SF, Jen JC. Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat Genet*. 2012 Apr 29;44(6):704-8.
- Wang J, Cortina G, Wu SV, Tran R, Cho JH, Tsai MJ, Bailey TJ, Jamrich M, Ament ME, Treem WR, Hill ID, Vargas JH, Gershman G, Farmer DG,

- Reyen L, Martín MG. Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N Engl J Med*. 2006 Jul 20;355(3):270-80.
- Wang L, Lewis MS, Johnson AW. Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA* 2005; 11(8):1291-302.
 - Wang X, Jia H, Jankowsky E, Anderson JT (2008) Degradation of hypomodified tRNA (iMet) in vivo involves RNA-dependent ATPase activity of the DExH helicase Mtr4p. *RNA* 14:107–116.
 - Wasmuth EV, Lima CD. Exo- and Endoribonucleolytic Activities of Yeast Cytoplasmic and Nuclear RNA Exosomes Are Dependent on the Noncatalytic Core and Central Channel. *Mol Cell*. 2012 Aug 14
 - Widner WR, Wickner RB. Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Mol Cell Biol*. 1993 Jul;13(7):4331-41.
 - Witharana C, Roppelt V, Lochnit G, Klug G, Evguenieva-Hackenberg E. Heterogeneous complexes of the RNA exosome in *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimie*. 2012 Jul;94(7):1578-87.
 - Wolfe JF, Adelstein E, Sharp GC. Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. *J Clin Invest*. 1977 Jan;59(1):176-8.
 - Wolski SC, Kuper J, Kisker C. The XPD helicase: XPanDing archaeal XPD structures to get a grip on human DNA repair. *Biol Chem*. 2010 Jul;391(7):761-5.
 - Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell*. 2011 Mar;2(3):202-14.
 - Yang CT, Hindes AE, Hultman KA, Johnson SL. Mutations in *gfpt1* and *skiv2l2* cause distinct stage-specific defects in larval melanocyte regeneration in zebrafish. *PLoS Genet*. 2007 Jun;3(6):e88.
 - Yang XF, Wu CJ, Chen L, Alyea EP, Canning C, Kantoff P, Soiffer RJ, Dranoff G, Ritz J. CML28 is a broadly immunogenic antigen, which is overexpressed in tumor cells. *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62(19):5517-22.
 - Zhao X, Yu YT. Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(2):550-8.

- Zhu B, Mandal SS, Pham AD, Zheng Y, Erdjument-Bromage H, Batra SK, Tempst P, Reinberg D. The human PAF complex coordinates transcription with events downstream of RNA synthesis. *Genes Dev.* 2005 Jul 15;19(14):1668-73

Annexes

Financement

Ce travail a été en partie financé par deux AORC (2008 et 2010) de l'Assistance Publique Hôpitaux de Marseille.

La quatrième année doctorale a fait l'objet d'une bourse de la fondation de l'Université de la Méditerranée et d'une allocation d'aide aux études de l'ADEREM.

Articles et présentations issus de ce travail de thèse

Communications orales

1. *Des anomalies du complexe SKI, un complexe multi protéique assurant la dégradation des ARN aberrants sont à l'origine des diarrhées syndromiques (syndrome tricho-hépto-enterique).* **Fabre A**, Martinez-Vinson C, Lacoste C, Colomb V, Royet J, Levy N, Badens C. 6èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale - Marseille, 2,3 &4 février 2012
2. *Des anomalies du complexe SKI, un complexe multi protéique assurant la dégradation des ARN aberrants sont à l'origine des diarrhées syndromiques (syndrome tricho-hépto-enterique).* **Fabre A**, Martinez-Vinson C, Lacoste C, Colomb V, Royet J, Levy N, Badens C. 33^{ème} congrès du Groupe Francophone d'Hépatologie Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique Nantes, Les 29-31 mars 2012

Communications affichées

1. *Search for a locus implicated in tricho-hepato-enteric syndrom.* **Fabre A**. XVIII colloque Aix Marseille université. 31 mai-1^{er} juin 2010
2. *Recherche d'un locus génomique impliqué dans les syndromes tricho-hépto-enterique.* **Fabre A**, Roquelaure B, Lacoste C, Martinez J, Peretti N, André N, Breton A, Martinez-Vincon CM, Levy N, Goulet O, Badens C. Assises de génétique humaine et médicale. 28-30 janvier 2010. Strasbourg
3. *Réévaluation clinique du syndrome Tricho-hépto-enterique.* **Fabre A**, Busa T, Martinez Vinson C, Roquelaure B , Costes ME , Breton A , Lachaux A , Odul E , Colomb V , Lemale J , Cezard JP, Goulet O, Sarles J, Badens C. 6èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale - Marseille, 2,3 &4 février 2012

Articles

1. *Mutations in SKIV2L cause Syndromic Diarrhea (Tricho-Hepato-Enteric syndrome).* **Fabre A**, Charroux B, Martinez-Vinson C, Roquelaure B, Odul E, Sayar E, Smith H, Colomb V, Andre N, Hugot JP, Goulet O, Lacoste C, Sarles J, Royet J, Levy N, Badens C. Am J Hum Genet. 2012 Apr 6;90(4):689-92. (IF : 11.68 en 2010)
2. *Novel mutations in TTC37 associated with Tricho-Hepato-Enteric syndrome.* **Fabre A**, Martinez-Vinson C, Roquelaure B, Missirian C, André N, Breton A, Lachaux A, Odul E, Colomb V, Lemale J, Cézard JP, Goulet O, Sarles J, Levy N, Badens C. Hum Mutat. 2011 32(3), 277-281. (IF : 5.956 en 2010)
3. *Syndromic diarrhea/Tricho-hepato-enteric syndrome.* **Fabre A**, Martinez-Vinson C, Goulet O, Badens C. en révision à Orphanet journal of rare disease

Les diarrhées syndromiques ont été décrites pour la première fois en 1994. Il s'agit d'un syndrome associant une diarrhée grave rebelle néonatale nécessitant une nutrition parentérale, une dysmorphie faciale, un retard de croissance intra-utéro, des anomalies immunitaires et une atteinte hépatique. Au cours de la décennie suivante, de nouveaux cas ont été décrits avec des dénominations variées, la plus fréquente étant : « syndrome tricho-hépto-entérique ». Du fait de la variabilité clinique et de l'absence de signe spécifique à l'examen anatomopathologique le diagnostic des Diarrhées syndromiques/Syndrome Tricho-hépto-entérique (DS/THE) est difficile.

Grâce à une collaboration multicentrique, nous avons pu constituer une cohorte homogène de 15 enfants atteints et de leurs apparentés. Par analyse de liaison et recherche de régions homozygotes dans ces familles, deux régions situées respectivement en 5q et en 6p ont été caractérisées. Dans la première région, le gène *TTC37* a été incriminé par la mise en évidence de 12 mutations pathogènes chez 9 des 15 patients. Bien que les connaissances sur *TTC37* soient fragmentaires, nous avons remarqué qu'il était parfois décrit comme étant l'orthologue de *SKI3* chez la levure. *SKI3* constitue, avec *SKI2* et *SKI8*, le complexe SKI qui, en tant que cofacteur de l'exosome, intervient dans un des systèmes de dégradation des ARN. L'exploration de *SKIV2L*, l'orthologue humain de *SKI2*, chez les 6 patients négatifs pour *TTC37* a permis de mettre en évidence des mutations pathogènes pour tous.

Nous avons voulu mieux caractériser l'expression des sous-unités du complexe SKI humain. Pour cela, nous avons établi le profil d'expression des transcrits de *TTC37* sur un panel de tissus sains, montrant une expression quasi ubiquitaire excepté dans quelques tissus, notamment le foie. Par la suite, nous avons exploré le niveau d'expression des transcrits de *TTC37*, *SKIV2L* et *XRN1* dans des cellules lymphoblastoïdes de patients et de témoins. Chez les cellules de patients atteints, que ce soit par des mutations de *TTC37* ou de *SKIV2L*, nous avons noté une diminution de l'expression des 3 transcrits. La localisation intracellulaire de *TTC37* a été étudiée en transfectant des cellules avec un plasmide contenant l'ADNc de *TTC37* portant une étiquette GFP. Ces expériences ont mis en évidence une localisation majoritairement cytoplasmique, comme dans la levure, avec un signal important dans l'appareil de Golgi. Enfin, nous avons testé 4 anticorps commerciaux dirigés contre *TTC37* ou *SKIV2L* sans obtenir de résultats reproductibles.

En conclusion, les DS/THE sont une maladie homogène d'un point de vue clinique mais génétiquement hétérogène et causée par des atteintes des gènes *TTC37* ou *SKIV2L*, tous deux constituants du complexe SKI.