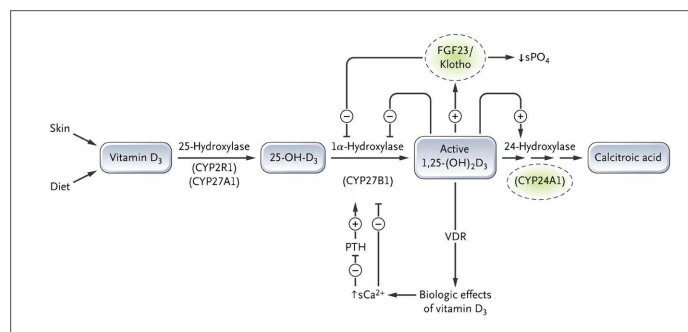


Apport de la génétique dans les troubles de la mobilité liés aux anomalies du métabolisme de la vitamine D

A/ Etat des lieux :

La vitamine D est classiquement associée au métabolisme phosphocalcique et osseux en augmentant la captation intestinale du calcium. Cependant, elle est passée d'un statut où son utilisation se limitait à la prévention du rachitisme chez le nourrisson à celui d'un traitement efficace pour la prévention des fractures ostéoporotiques, particulièrement chez les sujets âgés.

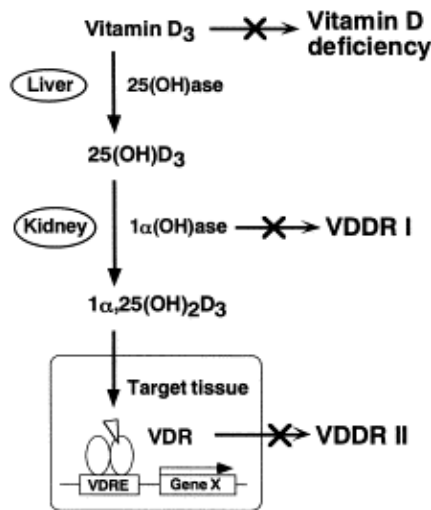
La vitamine D est une molécule apportée à la fois par l'alimentation (20 %) et synthétisée au niveau de l'épiderme sous l'action des rayons ultra-violet. Elle subit deux étapes d'hydroxylation au niveau du foie en position 25 (gène *CYP2R1*) puis au niveau du rein en position 1- α (gène *CYP27B1*), ce qui permet la synthèse du calcitriol ou 1,25(OH)₂D qui est la forme biologiquement active de la vitamine D. Le calcitriol est ensuite transporté par une protéine de liaison spécifique (VDBP) vers les cellules cibles où il exerce ses effets en se liant à un récepteur nucléaire spécifique appelé VDR. [1]. Il est inactivé par la 24 hydroxylase (gène *CYP24A1*).



Le rachitisme est une maladie du squelette de l'enfant en croissance dû à un défaut de sa minéralisation ce qui entraîne des déformations osseuses au niveau du thorax, au niveau des membres inférieurs avec des déformations caractéristiques en varus source de déformation du bassin et de retard de croissance. [1] Non traitées, ces lésions laissent des séquelles source de douleurs et de troubles de la motilité. La supplémentation systématique dès la naissance en vitamine D a réduit de façon importante l'incidence des rachitismes et de leurs conséquences pathologiques telles que l'hypocalcémie et les déformations osseuses.



Néanmoins, la supplémentation par la vitamine D ne prend pas en compte les rachitismes dits pseudo-carenciels (Vitamin D Deficiency Rickets = VDDR) liés à une anomalie de son métabolisme. Des anomalies génétiques ont été retrouvées à chacune des étapes de la biosynthèse de la forme active de la vitamine D [5-12]. Malheureusement, ces formes sont rares et restent peu connues. Cependant, il est indispensable de faire un diagnostic précis de ces anomalies afin d'apporter le traitement le plus efficace. Par exemple, l'administration de cholécalférol (VitD 3) sera inefficace en cas de mutation de *CYP27B1* alors que la prescription de dérivés 1 α hydroxylés assurera la restitution complète de l'architecture osseuse



Diagnostic des rachitismes pseudo-carentiel
(vitamin D deficiency rickets = VDDR)
D'après [2].

Enfin, si l'action endocrine de la vitamine D est bien connue, elle exerce aussi une action intracrine au sein d'organes qui possèdent à la fois une activité 1alpha hydroxylase et des récepteurs (muscles, système nerveux, colon ...). Une association est décrite entre des déficits en vitamine D et le risque de certains cancers, d'infections, de maladies inflammatoires ou cardiovasculaires. [3,4].

Le laboratoire de génétique moléculaire est *Centre de Référence des Maladies Rares du métabolisme du Calcium et du Phosphore* et à ce titre, reçoit des prélèvements de patients présentant une anomalie du métabolisme phosphocalcique à type d'hypocalcémie et des déformations osseuses compatibles avec le diagnostic de rachitisme ou des situations d'hypercalcémie morbide par anomalie du catabolisme de la 1,25(OH)₂ D. [5].

C'est actuellement le seul laboratoire en France qui étudie les gènes *CYP2R1*, *CYP27B1* et *CYP24A1* par PCR-séquençage. Néanmoins, lorsqu'une lésion est identifiée dans un gène, il faut démontrer que cette lésion est bien responsable de la pathologie et le taux faible de mutations retrouvées montre d'une part que le ciblage des individus susceptibles de présenter des lésions génétiques doit être amélioré et d'autre part que d'autres gènes doivent être impliqués.

B- Objectifs du projet

- caractériser l'activité biologique des variants génétiques identifiés et actuellement non classés.
- rechercher des critères cliniques et biologiques permettant d'orienter le diagnostic génétique et mettre en place les outils biologiques permettant de quantifier les métabolites intermédiaires sur la voie de la vitamine D afin d'améliorer la pertinence des études génétiques
- mettre à profit les techniques d'études pangénomiques (CGH array et NGS) disponibles sur le site pour avancer dans l'identification des bases moléculaires chez les sujets présentant un profil clinique et biologique typique mais chez lesquels aucune lésion génétique n'a été identifiée.

C-Matériel et Méthodes

Nous disposons d'une cohorte unique en France de patients (200) chez lesquels une étude génétique a été demandée afin d'identifier l'origine de l'anomalie du métabolisme du Calcium et du phosphore et/ou de la pathologie osseuse. Tous ces patients ont donné leur consentement aux études génétiques dans le respect des lois de bioéthique. Dès réception, les prélèvements seront anonymisés par attribution d'un numéro interne unique (numéro de famille et numéro d'individu). Seuls ces numéros seront utilisés.

Des lésions ont été identifiées chez une vingtaine de patients sur chacun des 3 gènes [5, 15]. Certaines n'ont jamais été décrites (variants non classés) et doivent être étudiées.

1 – Caractérisation de l'activité biologique des variants non classés.

a) Approche *in silico*.

L'accès à différentes banques de données, GenBank, Ensembl permet d'effectuer l'alignement des différents orthologues des gènes impliqués et d'examiner la localisation et la conservation des résidus de la protéine synthétisée. La conservation inter-espèce d'un résidu est en faveur de son importance sur le plan biologique. Si la variation touche ce résidu elle aura un risque élevé d'être délétère. Une modélisation de la protéine mutée peut être réalisée.[13].

b) Etude de l'activité biologique *in vitro*

L'activité de l'enzyme synthétisée à partir de la séquence normale ou mutée sera étudiée par des techniques d'expression *in vitro*. Nous partirons d'un plasmide contenant la forme sauvage de chaque gène, gracieusement fourni par le Docteur Glenville Jones (Université de Kingstone, Ontario) [9]. La mutation sera introduite en utilisant le kit QuickChange (Stratagene)

-Transfection

Les plasmides contenant soit la séquence sauvage soit la séquence mutée sont lipotransfectées (lipofectamine et Reagent Plus (Invitrogen) de façon transitoire dans des cellules procaryote type CHO que nous utilisons régulièrement au laboratoire [14]. Après culture et expression du gène, la présence de la protéine sera testée par Western-Blot selon des protocoles classiques du laboratoire en utilisant les anticorps spécifiques disponibles (Sant Cruz). Après lyse cellulaire, 100 µg de protéine sont séparés par électrophorèse en SDS PAGE 10 % puis transférées à une membrane de nitrocellulose. Après blocage des sites non spécifiques, la membrane est incubée en présence de l'anticorps dilué au 1/500^{ème} puis le complexe révélé par une incubation avec un anticorps secondaire anti souris et les protéines détectées par électrochimie luminescence.

- Analyse de l'activité enzymatique

Après transfection, les cellules sont laissées à incuber pendant 36 heures dans du milieu supplémenté soit en vitamine D₃, 25(OH)D₃, 1-alpha-25 (OH)D₃, tritiées pour étudier respectivement la 25-hydroxylase, la 1-α-hydroxylase et la 24-hydroxylase. Le profil métabolique sera étudié par HPLC en fonction du protocole décrit par Kauffman et al.[13].

2 – Etude de la relation génotype/phénotype

- Mise en place d'un fichier : L'objectif est d'identifier des paramètres cliniques et biologiques permettant de séparer les patients susceptibles d'avoir une mutation, des patients chez lesquels d'autres gènes pourraient être impliqués et doivent être recherchés. Nous avons actuellement près de 200 patients qui nous ont été adressés pour rechercher une anomalie du métabolisme de la vitamine D. Cette cohorte est unique en France. Nous avons identifié des lésions génétiques chez 20 % des sujets touchant les gènes CYP2R1, et CYP271 pour les patients présentant une hypocalcémie et CYP24A1 chez ceux qui présentent une hypercalcémie [5, 15].

- Etude des métabolites de la vitamine D par LCM/SMS

La vitamine D et ses métabolites principaux peuvent être dosés dans le sérum ou le plasma par des techniques utilisant la radioimmuno-assay. La chromatographie en phase liquide couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem, ou LC-MS/MS offre une meilleure spécificité et sensibilité et permet de s'exonérer des variations induites par la protéine de liaison [16,17]. L'objectif est d'étudier le profil des métabolites de la vitamine D en utilisant le LC-MS/MS disponible (*API 3200 Qtrap* de chez *Applied*®). Un défaut métabolique sera caractérisé par une accumulation du substrat et une diminution des produits. Après validation technique, les échantillons des patients présentant un déficit enzymatique seront testés et comparés avec des sujets sains et des sujets présentant des signes cliniques sans anomalies génétiques.

Les données cliniques et biologiques obtenues chez les sujets avec mutation ou sans mutation seront comparées entre elles et avec celles des sujets normaux (tests ANOVA et test paramétriques) afin de constituer des groupes homogènes de patients susceptibles de présenter les même anomalies génétiques.

3- Identification de nouveaux gènes.

L'objectif est de rechercher des lésions génétiques non mises en évidence par la technique classique de PCR-séquencage dans les gènes-candidats actuels et d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie en utilisant les techniques pangénomiques disponibles sur le site, CGH-array (Comparative Genomic Hybridization) haute résolution (2 μ) et Exome sur séquenceur à haut débit, (Ion torrent Life technologies et Illumina GAIIX). La constitution de groupes homogènes de patients (définis dans le chapitre 2) permettra d'augmenter la pertinence de ces analyses.

Une CGH array à 1 millions de clones recouvre le génome à une résolution moyenne de 1kb, et génère la description de variants de séquence extrêmement fréquents qui seront comparés aux bases de données génome entier (Ensembl, UCSC genome browser, Database of genomics variants). Le couplage CGH array-SNP (Agilent CGH+SNP 4*180K SurePrint G) permet de mettre en évidence des micro-remaniements (délétions, duplications) et également des pertes d'hétérozygotie (indicatrice de disomies uniparentales segmentaires) et de réaliser ainsi des études de liaison [18]. L'analyse des familles consanguines sera privilégiée compte tenu de la puissance de l'approche « étude de liaison » couplée au séquençage haut débit d'exome d'un individu atteint avec une analyse ciblée sur les loci d'intérêt. Le principe de la cartographie génétique par homozygotie est basé sur le fait que, dans les familles consanguines avec des maladies génétiques de transmission autosomique récessive, les enfants atteints ont hérité de la même mutation, transmise par leurs deux parents. On recherche la région pour laquelle des marqueurs polymorphiques sont homozygotes chez tous les enfants atteints et hétérozygotes chez les sains. Des mutations récurrentes dans les groupes homogènes de patients ou sur la base d'une analyse en trio (enfant atteint et les deux parents) seront recherchées selon une stratégie d'exome. Celle-ci consiste à capturer l'ensemble des régions codantes ou exome puis à les séquencer au moyen d'un séquenceur à haut débit. (Pour des explications détaillées de ce protocole voir la publication Nature 'Methods' de Gnirke [19]). Les données générées par séquençage d'exome sont informatiques et nécessitent le maniement de filtres pour faire le tri entre les différentes séquences identifiées, qui sont proches de milliers de variations de séquences à trier. Il sera indispensable de comparer les différents profils informatiques générés pour les cas index. La puissance de l'outil de séquençage d'Exome nécessite l'étude d'au moins 10 cas homogènes pour espérer dégager les gènes responsables. La masse de données informatiques sera travaillée avec un bio-informaticien pour comparaison des données obtenues par CGH array haute résolution et séquençage d'exome, en espérant des colocalisations. Enfin, les mutations seront validées par un séquençage type Sanger.

D- Résultats attendus

Il s'agit d'un projet ambitieux utilisant une cohorte unique en France de patients. La faisabilité de ce projet repose sur les compétences issues des cliniciens du centre de référence grâce à qui la cohorte de patients a été constituée, des biologistes et bioinformaticiens du laboratoire de génétique moléculaire qui apporteront leur expertise à l'étude génétique.

Les maladies rares du métabolisme du calcium et du phosphore sont rares car non diagnostiquées et l'importance de la vitamine D dans le domaine de la santé publique est régulièrement soulignée. L'identification des lésions génétiques permet de nommer de façon précise la maladie, d'éviter les errances thérapeutiques et de mettre en place un traitement adapté au déficit. Outre une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques ce travail permettra la mise en place d'outils diagnostiques pour une meilleure efficacité thérapeutique et un conseil génétique.

Bibliographie

- 1-Holick M, Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
- 2-Kato S, Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene causes vitamin D-dependant rickets type I. *Mol Cell Endoc* 1999; 156:7-12
- 3-Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, et al. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2012;33(3):456-92.
- 4-Fluss J, Kern I, de Coulon G, Gonzalez E, Chehade H. Vitamin D deficiency: A forgotten treatable cause of motor delay and proximal myopathy. *Brain Dev.* 2012 Dec 26
- 5-Castanet M, Mallet E, Kottler ML. Lightwood Syndrome revisited with a novel mutation in *CYP24A1* and vitamin D supplement recommendations – A particularly informative family case. *Pediatrics* 2013 in press
- 6-Wang JT, Lin CJ, BurrIDGE SM, et al..Genetics of vitamin D 1alpha-hydroxylase deficiency in 17 families. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(6):1694-702
- 7-Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW.Genetic evidence that the human *CYP2R1* enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004
- 8-Al Mutair AN, Nasrat GH, Russell DW. Mutation of the *CYP2R1* vitamin D 25-hydroxylase in a Saudi Arabian family with severe vitamin D deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(10):E2022-5.
- 9- Jones G, Prosser DE, Kaufmann M.25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (*CYP24A1*): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys.* 2012; 523(1):9-18.
- 10-Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, et al. Mutations in *CYP24A1* and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med.* 2011 Aug 4;365(5):410-21
- 11-Tosson H, Rose SR. Absence of mutation in coding regions of *CYP2R1* gene in apparent autosomal dominant vitamin D 25-hydroxylase deficiency rickets. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May;97(5):E796-801
- 12-Dauber A, Nguyen TT, Sochett E, et al. Genetic defect in *CYP24A1*, the vitamin D 24-hydroxylase gene, in a patient with severe infantile hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Feb;97(2):E268-74
- 13-Kaufmann M, Prosser DE, Jones G. Bioengineering anabolic vitamin D-25-hydroxylase activity into the human vitamin D catabolic enzyme, cytochrome P450 *CYP24A1*, by a V391L mutation. *J Biol Chem.* 2011 Aug 19;286(33):28729-37.
- 14-Galmiche G., Richard N., Corvaisier S., & Kottler M.L:The expression of aromatase in gonadotropes is regulated by estradiol and GnRH in a manner that differs from the regulation of LH. *Endocrinology*, 2006 Sep;147(9):4234-44
- 15-Abeguile G, Coudray N, Richard-N, Kottler ML; Six novel mutations in 25-hydroxyvitamin D3 1alpha hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D deficiency rickets." *European Congress of Endocrinology*, Prague, 24-28 avril 2010.
- 16-Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem.* 2012 Mar;58(3):543-
- 17-Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytfanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2011 Mar;57(3):441-8.
- 18- Doi H, et al. Exome sequencing reveals a homozygous SYT14 mutation in adult-onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am J Hum Genet.* 2011 Aug 12;89(2):320-7
- 19- Gnirke, A. et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27, 182-189.