

Une thérapie par ARN interférence allèle-spécifique corrige un défaut de matrice extracellulaire dans le syndrome de Schuurs-Hoeijmakers

Auteurs :

Lylia Mekzine, Natalia Pinzón, Kamel Mamchaoui, Maria Kondili, Bruno Cadot, Marc Bitoun, Delphine Trochet

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2025.07.010>

Résumé

L'inhibition allèle-spécifique par ARN interférence constitue une approche thérapeutique prometteuse pour les maladies génétiques dominantes, en ciblant spécifiquement l'ARNm produit par l'allèle muté.

Ce travail rapporte le développement de cette stratégie pour le syndrome de Schuurs-Hoeijmakers (SHMS), un trouble neurodéveloppemental rare caractérisé par une déficience intellectuelle, des anomalies craniofaciales et des malformations congénitales, sans traitement disponible à ce jour.

La plupart des cas de SHMS sont dus à une mutation récurrente de novo hétérozygote faux-sens (c.607C>T [p.Arg203Trp]) dans le gène *PACSI*, qui code pour la protéine PACS1 (phosphofurin acid cluster sorting 1), une protéine multifonctionnelle de tri intracellulaire.

Par un criblage *in vitro* de fibroblastes dérivés de patients, une équipe du Centre de Recherche en Myologie (Unité 974 Inserm-Sorbonne Université, Paris) a identifié plusieurs séquences d'ARN interférents (siRNA) capables de réduire spécifiquement l'expression du transcrit muté de *PACSI*, tout en épargnant l'ARNm sauvage.

De plus, l'analyse transcriptomique des fibroblastes SHMS a révélé des altérations de l'organisation de la matrice extracellulaire dans les cellules mutées, incluant une surexpression du gène *COL8A1* et une accumulation extracellulaire de la protéine COL8A1. Le traitement avec le siRNA allèle-spécifique le plus efficace a corrigé cette dérégulation de COL8A1.

Cette étude apporte ainsi la preuve de concept d'une thérapie par ARN interférence allèle-spécifique pour le SHMS dans des cellules dérivées de patients, et met en lumière un mécanisme physiopathologique impliquant une dysfonction de la matrice extracellulaire.

Introduction

Le syndrome de Schuurs-Hoeijmakers (SHMS [MIM : 615009]) est un trouble neurodéveloppemental caractérisé par une déficience intellectuelle, des anomalies craniofaciales et des malformations congénitales. Les personnes atteintes présentent classiquement une dysmorphie faciale associée à un retard léger à modéré du langage et du développement psychomoteur. Les individus atteints de SHMS peuvent également souffrir de crises d'épilepsie, d'autisme, d'hypotonie, de troubles de l'alimentation et d'autres anomalies congénitales touchant le cerveau, le cœur et l'appareil urogénital. Cette maladie rare, autosomique dominante, est due à des mutations dominantes du gène *PACSI* (MIM : 607492). Fait marquant, presque tous les individus atteints de SHMS partagent la même mutation *de novo* faux-sens du gène *PACSI* (c.607C>T [p.Arg203Trp]), qui entraîne une substitution d'une arginine par un tryptophane en position 203.

Le gène *PACSI* code la protéine phosphofurin acid cluster sorting 1 (PACS1), une protéine cytosolique multifonctionnelle de tri, impliquée dans l'adressage de protéines à leurs compartiments intracellulaires spécifiques. PACS1 est également une protéine nucléaire impliquée dans la stabilité de la chromatine, la réparation de l'ADN et le trafic nucléocytoplasmique des ARN. PACS1 est composée de quatre domaines principaux :

- une région N-terminale apparentée à la famille des protéines atrophines,
- une région de liaison à la furine (FBR) qui interagit avec ses partenaires protéiques cargo,
- une région centrale à fonction auto-régulatrice contenant une séquence de localisation nucléaire (NLS),
- une large région C-terminale.

L'altération récurrente p.Arg203Trp de PACS1 est localisée dans la région FBR et peut affecter la liaison aux cargos protéiques, mais les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore complètement élucidés.

Au niveau moléculaire, PACS1 mutée influence la déacétylation des microtubules et l'intégrité de l'appareil de Golgi via l'interaction avec HDAC6, et augmente la stabilité de la protéine PACS1 ainsi que sa propension à former des agrégats. Au niveau fonctionnel, PACS1 mutée altère la migration des cellules de la crête neurale chez le poisson-zèbre et induit une expression dérégulée de gènes impliqués dans la fonction synaptique ainsi que des anomalies électrophysiologiques dans des organoïdes de neurones corticaux dérivés de patients. Ces impacts rapportés, associés à la surexpression de PACS1 observée lors du développement cérébral, pourraient être à l'origine du phénotype neurodéveloppemental chez les patients.

L'altération hétérozygote de PACS1 p.Arg203Trp résulte probablement en un gain de fonction ou un effet dominant négatif. L'absence d'haplo-insuffisance est confirmée chez la souris *Pacs1*^{-/-}, où l'absence totale de *Pacs1* entraîne seulement un léger déficit lymphocytaire sans phénotype neurologique, ainsi que chez l'Homme, où une perte de fonction liée à une délétion homozygote de PACS1 a été associée à un trouble neurodéveloppemental léger, sans symptômes de SHMS et avec une pénétrance incomplète.

Dans ce contexte, la suppression spécifique de l'allèle muté constitue une approche thérapeutique de choix pour le syndrome PACS1, en l'absence de tout traitement disponible.

L'ARN interférence allèle-spécifique (AS-RNAi) est un outil puissant utilisé pour réduire l'expression de l'allèle muté dans les maladies génétiques dominantes, tout en épargnant l'allèle normal, ce qui préserve environ 50 % de la protéine et maintient sa fonction. Des bénéfices thérapeutiques ont déjà été démontrés dans des cellules de patients et dans des modèles animaux, et des essais cliniques basés sur cette stratégie ont été menés.

Ce travail rapporte le développement d'une approche AS-RNAi ciblant la mutation c.607C>T (p.Arg203Trp) du gène *PACSI* responsable du SHMS. L'AS-RNAi développée a restauré un défaut de la matrice extracellulaire (ECM), mis en évidence par une analyse transcriptomique réalisée dans des fibroblastes issus de patients.

Extraits de sections

Cultures cellulaires et transfection

Des lignées de fibroblastes issues de témoins sains et de patients porteurs de la mutation *PACSI* ont été obtenues auprès du Coriell Institute (<https://www.coriell.org/> ; identifiants GM27650, GM27159, GM27651 et GM27160) et immortalisées par transduction de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) via la plateforme MyoLine d'immortalisation de cellules humaines (Centre de Recherche en Myologie, Paris, France). Le consentement éclairé pour l'utilisation des cellules à des fins de recherche a été obtenu conformément aux directives institutionnelles.

Identification de siRNA spécifiques de PACS1 mutée dans des cellules hétérozygotes

Un criblage de siRNA allèle-spécifiques capables de réduire l'expression de l'allèle *PACSI* muté c.607C>T (p.Arg203Trp), sans affecter l'allèle sain, a été réalisé dans des fibroblastes immortalisés provenant de patients. Un test de RT-PCR a permis de distinguer et de quantifier les ARNm sains et mutés. L'efficacité de l'inhibition et la spécificité allèle-spécifique ont été évaluées pour 12 siRNA.

Discussion

Le syndrome de Schuurs-Hoeijmakers (SHMS) associe un trouble neurodéveloppemental entraînant divers handicaps neurologiques avec des atteintes systémiques touchant les yeux, le tube digestif, le cœur et/ou les muscles squelettiques. Plus de 98 % des personnes atteintes portent la même mutation dans le gène *PACSI*, ce qui en fait la cible prioritaire dans une perspective thérapeutique. Cette étude présente les premières étapes du développement d'une thérapie dirigée contre cette cible en utilisant un ARN interférent, alliant efficacité et spécificité de l'ARN interférence.

Données et disponibilité du code

Les données de RNA-seq générées dans le cadre de cette étude ont été déposés dans l'European Nucleotide Archive (ENA) de l'EMBL-EBI sous le numéro d'accès ENA: PRJEB91660 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser>).

Remerciements

Ce travail a été possible grâce aux plateformes du Centre de Recherche en Myologie (Institut de Myologie, Paris, France) : MyoImage pour l'imagerie et MyoLine pour l'immortalisation des cellules), au Coriell Institute pour la mise à disposition des fibroblastes de patients et de témoins, aux conseils de Corine Gartoux, Dimitris Kourtzas et Valérie Allamand pour les expériences sur le collagène, et grâce aux soutiens de l'Inserm, de Sorbonne Université, de l'Agence Nationale de la Recherche et de l'Association Française Syndrome PACS1 – Schuurs-Hoeijmakers.

Déclaration d'intérêts

Une demande de brevet liée à ce travail a été déposée sous la référence EP25306043.8.

References (60)

- J.H.M. Schuurs-Hoeijmakers *et al.*
[Recurrent De Novo Mutations in PACS1 Cause Defective Cranial-Neural-Crest Migration and Define a Recognizable Intellectual-Disability Syndrome](#)
Am. J. Hum. Genet.
(2012)
- L. Wan *et al.*
[PACS-1 Defines a Novel Gene Family of Cytosolic Sorting Proteins Required for trans-Golgi Network Localization](#)
Cell
(1998)
- M.S. Veena *et al.*
[Dysregulation of hsa-miR-34a and hsa-miR-449a leads to overexpression of PACS-1 and loss of DNA damage response \(DDR\) in cervical cancer](#)
J. Biol. Chem.
(2020)
- S. Dudhal *et al.*
[Development of versatile allele-specific siRNAs able to silence all the dominant dynamin 2 mutations](#)
Mol. Ther. Nucleic Acids
(2022)
- D. Trochet *et al.*
[Benefits of therapy by dynamin-2-mutant-specific silencing are maintained with time in a mouse model of dominant centronuclear myopathy](#)
Mol. Ther. Nucleic Acids
(2022)
- X. Xia *et al.*

Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo

Neurobiol. Dis.

(2006)

- S.A. Leachman *et al.*

First-in-human Mutation-targeted siRNA Phase Ib Trial of an Inherited Skin Disorder

Mol. Ther.

(2010)

- K. Auré *et al.*

Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene

Neuromuscul. Disord.

(2007)

- N.U.B. Hansen *et al.*

Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling

Clin. Biochem.

(2016)

- Q. Li *et al.*

Collagen VIII in vascular diseases

Matrix Biol.

(2024)

- L. Rylaarsdam *et al.*

In search of a cure: PACS1 Research Foundation as a model of rare disease therapy development

Trends Genet.

(2022)

- B.S. Dirk *et al.*

PACS-1 and adaptor protein-1 mediate ACTH trafficking to the regulated secretory pathway

Biochem. Biophys. Res. Commun.

(2018)

- M. Sun *et al.*

Par3 and aPKC regulate BACE1 endosome-to-TGN trafficking through PACS1

Neurobiol. Aging

(2017)

- P.H. Lucena *et al.*

A Novel PACS1 Variant Associated With Schuurs-Hoeijmakers Syndrome Phenotype in an Indigenous Descendant in Brazil: A Case Report

Cureus

(2022)

- N. Miyake *et al.*

A novel missense mutation affecting the same amino acid as the recurrent PACS1 mutation in Schuurs-Hoeijmakers syndrome

Clin. Genet.

(2018)

- A. Moller-Hansen *et al.*

Do PACS1 variants impeding adaptor protein binding predispose to syndromic intellectual disability?

Am. J. Med. Genet.

(2023)

- J.H.M. Schuurs-Hoeijmakers *et al.*
Clinical delineation of the *PACSI* -related syndrome—Report on 19 patients
Amer. J. Med. Genet. Pt A
(2016)
- M. Arnedo *et al.*
Molecular Basis of the Schuurs–Hoeijmakers Syndrome: What We Know about the Gene and the PACS-1 Protein and Novel Therapeutic Approaches
IJMS
(2022)
- J. Tenorio-Castaño *et al.*
Schuurs-Hoeijmakers Syndrome (PACS1 Neurodevelopmental Disorder): Seven Novel Patients and a Review
Genes
(2021)
- R.T. Youker *et al.*
At the crossroads of homeostasis and disease: roles of the PACS proteins in membrane traffic and apoptosis
Biochem. J.
(2009)
- E. Nair-Gill *et al.*
Calcium flux control by Pacs1-Wdr37 promotes lymphocyte quiescence and lymphoproliferative diseases
EMBO J.
(2021)
- C. Mani *et al.*
The multifunctional protein PACS-1 is required for HDAC2- and HDAC3-dependent chromatin maturation and genomic stability
Oncogene
(2020)
- S.M. Trothen *et al.*
PACS-1 contains distinct motifs for nuclear-cytoplasmic transport and interacts with the RNA-binding protein PTBP1 in the nucleus and cytosol
FEBS Lett.
(2022)
- S. Villar-Pazos *et al.*
Neural deficits in a mouse model of PACS1 syndrome are corrected with PACS1- or HDAC6-targeting therapy
Nat. Commun.
(2023)
- L. Rylaarsdam *et al.*
iPSC-derived models of PACS1 syndrome reveal transcriptional and functional deficits in neuron activity
Nat. Commun.
(2024)
- M. Cardoso-Moreira *et al.*
Gene expression across mammalian organ development
Nature
(2019)
- Y. Liu *et al.*

A Novel Multi-Exon Deletion of PACS1 in a Three-Generation Pedigree: Supplements to PACS1 Neurodevelopmental Disorder Spectrum
Front. Genet.
(2021)

- D. Trochet *et al.*
Therapy for dominant inherited diseases by allele-specific RNA interference: successes and pitfalls
Curr. Gene Ther.
(2015)
- J. Kaplan *et al.*
Restoration of normal BMP signaling levels and osteogenic differentiation in FOP mesenchymal progenitor cells by mutant allele-specific targeting
Gene Ther.
(2012)
- R.D. Klotwijk *et al.*
Allele-specific silencing of the dominant disease allele in sialuria by RNA interference
FASEB J.
(2008)

D'autres références sont disponibles dans la version complète de l'article.