

Résumé des travaux de recherche ayant reçu le soutien financier de l'AFSA

1. Etat d'avancement du projet intitulé : Quantification des anomalies des EEG et identification de biomarqueurs dans le cadre du syndrome d'Angelman (SA)

Coordinateur du projet : Benjamin Philpot, Université de Caroline du Nord

La présence d'un rythme delta a été décrite comme une anomalie importante des électroencéphalographies (EEG) de personnes SA. Néanmoins, il y a nécessité de quantifier rigoureusement cet effet pour pouvoir l'utiliser efficacement en tant que biomarqueur. C'est l'objectif du projet porté par le Dr B. Philpot. Son équipe a quantifié le rythme delta chez la souris et chez l'Homme en utilisant des méthodes d'analyse de pointe dans une cohorte de patients SA. Leur étude a été publiée dans la revue *The Journal of Neurodevelopmental Disorders* en avril 2017 sous l'intitulé traduit en français « le rythme delta de l'EEG est un biomarqueur fiable dans le cadre du SA : analyse menée en parallèle chez la souris et l'Homme ».

Des exemples de résultats publiés dans cet article (Sidorov *et al.*, *J Neurodev Disord.* 2017) sont présentés ci-dessous.

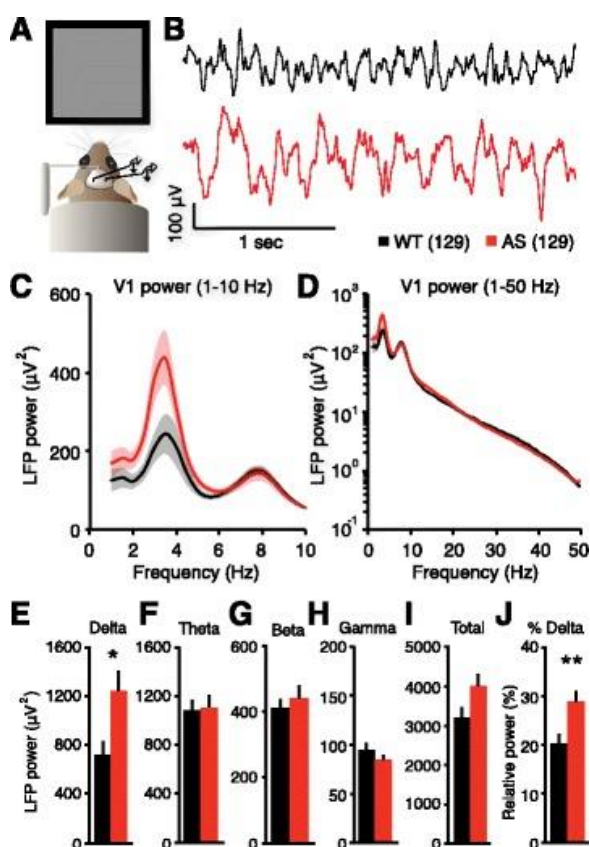


Figure 1 : Augmentation de la puissance delta chez les souris SA. A. Enregistrement LFP du cortex primaire visuel chez une souris éveillée. **B.** Exemples représentatifs montrant une

augmentation du rythme delta chez les souris SA. **C, D.** Spectre de puissance des groupes analysés (WT, n (nombre d'animaux) = 23, SA : n = 24 ; l'ombre indique l'erreur standard ; D est une représentation sur une échelle logarithmique). **F** (Theta (5-10 Hz), **G** (Beta, 13-30 Hz), **H** (gamma, 30-50 Hz), et **I** (total, 1-50 Hz) montrent que seule la puissance des ondes delta est différentes entre les deux groupes (theta: $p = 0.858$, beta: $p = .509$, gamma: $p = 0.304$, total: $p = 0.075$). **J** Augmentation relative de la puissance des ondes delta dans les souris SA (** $p = 0.008$). D'après Sidorov *et al.*, *J Neurodev Disord.* 2017.

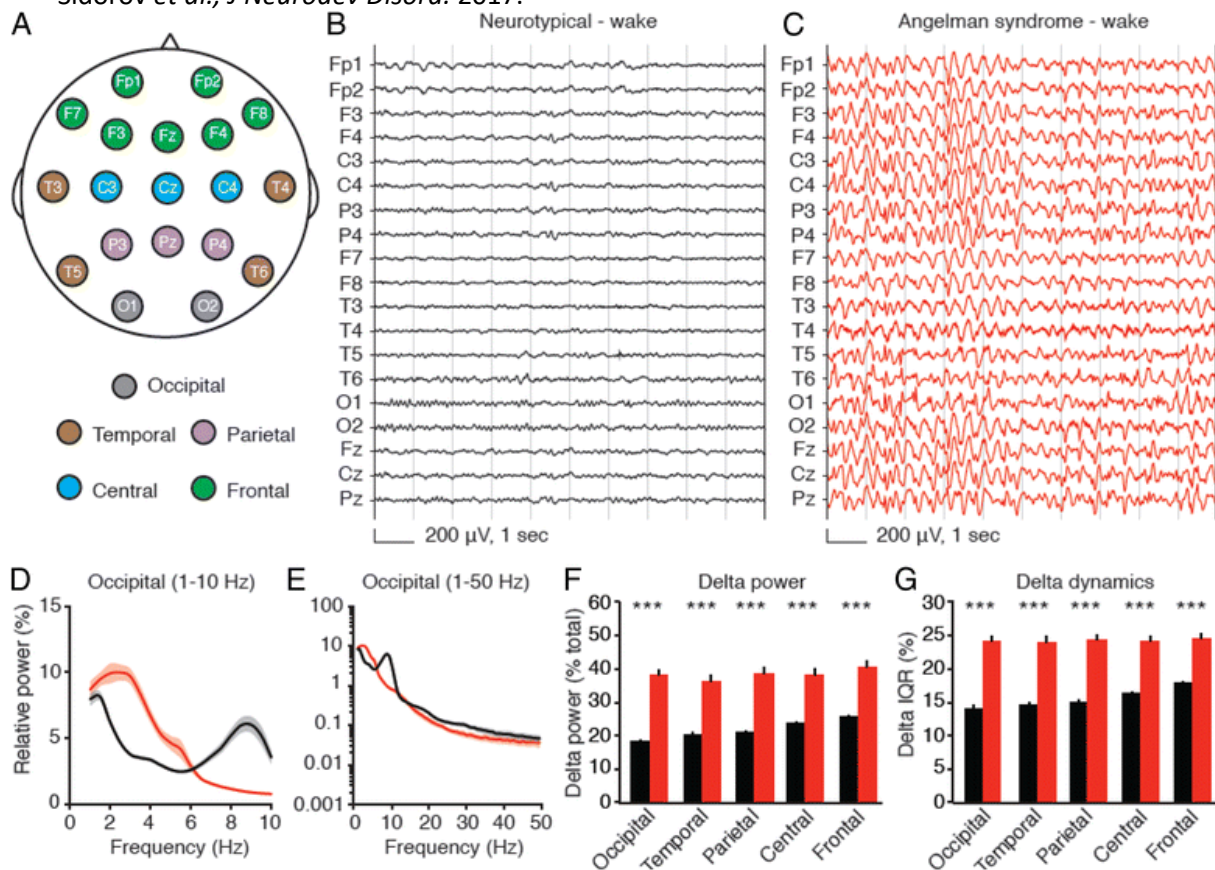


Figure 2 : Rythme delta observés chez des enfants SA durant l'éveil

En noir : groupe contrôle neurotypique (NT) ; en rouge : groupe enfants SA

A. Représentation schématique du positionnement des électrodes de l'EEG.

B. Exemple de résultat obtenu pour un enfant NT

C. Exemple de résultat obtenu pour un enfant SA

D,E. Spectre de la puissance des groupes, mesurée au niveau des électrodes occipitales (NT: n = 54, AS: n = 26; l'ombre indique \pm erreur type)

F, G. La puissance delta et la dynamique des ondes delta sont augmentées (** $p < 0.0001$, Student's *t* test)

D'après Sidorov *et al.*, *J Neurodev Disord.* 2017 (erratum)

Précision lexicale (<https://www.rvd-psychologue.com/neurofeedback-eeq-ondes-cerveaux.html>) :

« Un **rythme cérébral** désigne une oscillation électromagnétique dans une bande de fréquences donnée résultant de l'activité électrique cohérente d'un grand nombre de neurones du cerveau telle qu'on peut l'observer en (EEG).

Une **oscillation** est une variation d'une grandeur mécanique, électrique, caractérisée par un changement périodique de sens. Cette variation s'exprime en un aller et retour d'un corps autour

d'une position d'équilibre, passant successivement par une valeur maximale et une valeur minimale. Les oscillations peuvent être régulières (périodiques) ou décroissantes (amorties).

Le cycle d'une oscillation est le temps écoulé entre deux passages successifs par la position d'équilibre. La fréquence d'une oscillation est le nombre de cycles par seconde exprimé en hertz (Hz). Le hertz est la fréquence d'un courant dont la période est une seconde. L'amplitude est une grandeur qui exprime l'écart ou l'éloignement d'une oscillation par rapport à son point d'équilibre. L'amplitude est liée à la **puissance** des impulsions électriques produites par le cerveau. »

Précisions supplémentaires (sam.smh.free.fr/Antennes-relais/.../OndesCerebrales-Electroencephalogramme.doc) : « Les ondes DELTA correspondent à un état inconscient. Les ondes cérébrales **DELTA** ont les plus basses fréquences (0,1>3Hz). Les ondes **DELTA** sont impliquées dans notre capacité d'intégration et de laisser aller. Elles reflètent l'esprit sans connaissance. C'est le rythme dominant des enfants en bas âge, de moins de un an. Il tend à être le plus haut en amplitude pour les ondes les plus lentes. Nous augmentons nos ondes **DELTA** afin de diminuer notre conscience du monde physique. »

L'équipe a notamment montré que la **puissance delta** était largement augmentée chez les souris SA et les enfants SA, relativement à des populations contrôles. Ces ondes delta sont présentes pendant l'éveil et le sommeil, elles sont généralisées à travers le néocortex, et plus prononcées au cours du jeune âge.

Les auteurs signalent dans leur rapport que cette étude leur a permis de développer des outils mathématiques et informatiques pour étudier ces ondes delta, outils qui sont à la disposition de la communauté.

Les auteurs signalent que leurs travaux en cours portent sur :

- **Objectif 1** : La mesure de l'activité delta (puissance, dynamique) chez des souris SA en cage laissées libres de leurs mouvements. Cette analyse a pour but de suivre le profil du rythme delta de façon corrélée au comportement.
- **Objectif 2** : La poursuite de l'étude des signatures des EEG chez les enfants SA. Les auteurs signalent qu'ils sont allés au-delà de l'objectif initialement prévu (définition de nouvelles signatures EEG chez les enfants atteints de SA, analyse de la cohérence et de la structure du sommeil). Ils ont en effet également initié une nouvelle collaboration avec le Dr Gali Heimer, directeur de la clinique du syndrome d'Angelman au centre médical Chaim Sheba à Ramat Gan, en Israël. Alors que leur étude antérieure comparait les ondes delta chez les enfants SA et les contrôles neurotypiques, cette collaboration permettra de comparer directement le syndrome SA et celui de Rett. De plus, ils auront accès aux données médicales du patient, ce qui leur permettra de relier les ondes delta à des signes marquants du syndrome. Dans l'ensemble, ces deux nouvelles directions non prévues (nouvelles analyses de données existantes, nouvelle collaboration) représentent une extension significative de l'objectif 2 initialement proposé.
- **Objectif 3** : Comprendre les mécanismes sous-tendant les caractéristiques des EEG observés dans le cadre du SA.

Les auteurs signalent qu'une autre équipe (Born *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017) a publié récemment des données se rapportant à l'objectif 1.

Enfin, les auteurs souhaitent conserver leurs axes de recherche (sans ajustement). Ils indiquent qu'ils pensent que ce travail permettra de mieux comprendre la relation entre l'activité delta et les symptômes du SA et contribuera à établir un lien entre activité delta,

cohérence et structure du sommeil à même de servir de biomarqueurs fiables et mesurables dans le cadre d'essais cliniques futurs.

2. Rapport final du projet intitulé : Caractérisation *in vivo* des protéines interagissant avec la protéine E6AP

Coordinateurs du projet : Geeske M. van Woerden et Ype Elgersma

Ce projet avait pour but d'exploiter les données récemment obtenues par le groupe concernant l'identification des protéines partenaires de E6AP (autre nom de la protéine UBE3A, mutée dans le cadre du SA) au sein des neurones, de façon à mieux comprendre quels processus moléculaires sont perturbés dans le cadre du SA. Dans le rapport, les protéines interagissant avec E6AP sont appelées UIP (probablement pour *UBE3A interacting proteins* *Protéines inter-agissantes avec UBE3A*).

Objectif 1 : Validation des UIP dans les neurones (*in vitro* et *in vivo*)

Les auteurs ont analysé le niveau d'expression, dans le cerveau de souris SA, des UIP qu'ils avaient identifiées au préalable. La majorité des UIP étudiées ne sont pas davantage exprimées dans le cerveau des souris SA. Cela signifie que l'ubiquitination de ces protéines par E6AP n'entraîne probablement pas leur dégradation dans un contexte normal. C'est probablement la fonction de ces protéines qui est modulée plutôt que leur stabilité.

Les auteurs ont focalisé leur attention sur une UIP particulière nommée PML car elle a été décrite comme importante dans le développement cortical. Le niveau de PML dans le cerveau des souris est légèrement augmenté, mais ce n'est qu'une tendance, non significative d'un point de vue statistique. Les auteurs creusent actuellement cette question, en mesurant le niveau de PML à différents âges de la souris, de façon à comprendre si à certains stades les niveaux d'expression de PML sont effectivement augmentés et s'il y a des moments spécifiques au cours desquels UBE3A régule les niveaux d'expression de la PML.

Objectif 2 : Surexpression de certaines UIP dans des cellules neuronales et analyse de leur morphologie

Les auteurs ont observé que la surexpression de UIP4 (sous-unité protéasomale PSMD4, également appelée RPN10 ou S5a), de UIP2 ou de UIP3 ne provoque pas de grands changements dans la morphologie neuronale.

Par contre, la surexpression d'une autre UIP nommée PML a un impact sur la physiologie neuronale : les neurones surexprimant PML présentent des déficits marqués de la maturation neuronale, des neurites plus courts et moins nombreux. De façon intéressante, la diminution de l'expression de PML n'a quant à elle pas d'effet très marqué sur la morphologie neuronale (les auteurs ont noté une légère diminution du nombre de neurites mais pas de leur longueur).

Objectif 3 : Electroporation des gènes codant les UIP au sein de neurones *in utero* suivie de l'analyse par immunohistochimie

De façon à explorer l'impact de la surexpression des UIP dans des neurones au sein d'un cerveau en développement, les auteurs ont introduit par électroporation un plasmide codant les UIP au sein de neurones *in utero*. Ils ont ensuite suivi l'effet de cette surexpression sur la migration des neurones cibles.

Ils ont observé que la surexpression de la protéine PML ne cause pas de déficit profond de migration, mais un défaut modéré, avec certains neurones qui restent à la traîne et d'autres qui migrent normalement. La diminution de l'expression de la protéine PML (en utilisant des shRNA dirigés contre l'ARN codant la PML) affecte sévèrement la migration, confirmant les données de la littérature montrant que la protéine PML joue effectivement un rôle important dans le développement neuronal.

L'électroporation *in utero* d'un plasmide codant la protéine RPN10 révèle que la surexpression de la protéine RPN10 n'affecte en aucune façon la migration. La réduction de l'expression de RPN10 (par électroporation *in utero* de shRNA dirigés contre les ARN codant RPN10) cause un retard clair de la migration des neurones cibles. Il y a un clair défaut de la migration à un jour après la naissance qui se normalise après 7 jours, ce qui signe un retard plus qu'un déficit.

La surexpression d'UIP2 ou UIP3 n'affecte pas la migration neuronale.

Compte-tenu des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la protéine PML lors de ces expériences, les auteurs ont souhaité savoir si la surexpression de PML avait un rôle dans le phénotype des souris SA. Pour cela, des souris $UBE3A^{m-/p+}$ ont été croisées avec une souris inactivée dans le gène codant la PML. La réduction de l'expression de la PML dans un fond génétique $UBE3A^{m-/p+}$ n'améliore pas les phénotypes observés chez les souris $UBE3A^{m-/p+}$.

Conclusion et perspectives :

Compte-tenu des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, les auteurs concluent à présent que, bien que la PML soit une cible de la protéine UBE3A, elle ne semble pas jouer de rôle dans le comportement des souris SA. RPN10, UIP2 et UIP3 sont des protéines interagissant avec UBE3A, mais leur niveau d'expression ne semble pas régulé par UBE3A. De plus, la surexpression de ces protéines n'affecte pas le développement neuronal *in vitro* ni le fonctionnement neuronal *in vivo* (mesuré par la migration des neurones). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la pertinence physiologique de l'interaction entre UBE3A et ces UIP.

Les articles dont la soumission est prévue pour fin 2017 :

- Les résultats combinés du laboratoire et de celui du Dr Distel sur l'interaction de la PML avec UBE3A et son rôle (ou son absence de rôle) dans le cadre du SA
- Les résultats combinés du laboratoire et de celui du Dr Distel sur la compréhension de la signification physiologique de l'interaction entre RPN10 et UBE3A.

Pour UIP2 et UIP3, des données supplémentaires doivent être obtenues avant de soumettre un article.

3. Rapport final : Elucidation des mécanismes moléculaires sous-tendant le rôle de la protéine E6AP dans le fonctionnement du cerveau

Coordinateur : Ben Distel

1^{ère} période (0-6 mois) : **Objectif 1 - Validation des UIP en testant l'ubiquitination et la dégradation dépendantes de E6AP**

UIP2 et UIP4 (sous-unité protéosomale aussi appelée PSMD4, RPN10 ou S5a) sont toutes deux ubiquitinylées de façon dépendante de E6AP. L'ubiquitinylation de UIP4 peut aussi se faire par d'autres E3 ligases.

En utilisant un système de protéine de fusion DHFR-ubiquitine, les auteurs ont montré que les protéines UIP2 et UIP3 sont des substrats *in vivo* de E6AP. De façon remarquable, ni UIP2 ni UIP3 ne sont dégradées de façon dépendante de E6AP au sein de cellules humaines HEK293T. Il n'y a pas d'accumulation de formes ubiquitinylées de ces protéines lors d'un traitement avec un inhibiteur du protéasome. Ainsi, alors que UIP2 et UIP3 sont des cibles de E6AP, elles ne semblent pas être des substrats de cette protéine *in vivo*. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre cette observation.

2^{ème} période (6-12 mois) : **Objectif 2 – Utilisation de mutations d'E6AP de patients pour sélectionner des cibles critiques**

Les auteurs ont montré que les UIP2, 3 et 4 se fixaient chacune sur des régions différentes du domaine N-terminal de la protéine E6AP. Par la méthode du double hybride et du GST-pull down, les auteurs ont montré que la région N-terminale de E6AP portant le domaine de fixation à doigts de zinc (AZUL) est nécessaire et suffisant pour fixer UIP4. Les auteurs ont testé l'impact de mutations (dont une mutation faux sens C21Y associée au SA) dans un des doigts de zinc de cette région sur l'interaction avec UIP4. Aucune de ces mutations n'a un impact sur cette interaction, ce qui indique que les doigts de zinc de E6AP ne sont pas impliqués dans l'interaction avec UIP4. Des analyses supplémentaires ont montré que deux hélices alpha du domaine AZUL de E6AP sont impliquées dans l'interaction avec UIP4. Réciproquement, le site de fixation à E6AP est localisé dans un domaine C-terminal de 55 acides de la protéine UIP4.

Les auteurs ont montré qu'environ 3 à 5 % des protéines E6AP sont associées au protéasome (sorte de poubelle à protéines cellulaires dont UIP4 est une des sous-unités) de façon dépendante du domaine AZUL de E6AP. Le rôle de cette interaction est en cours d'exploration.

Les auteurs ont introduit plus de 20 mutations faux sens (retrouvées chez les patients SA) dans le domaine N-terminal de E6AP par mutagenèse dirigée. Trois d'entre elles sont localisées dans la région de fixation spécifique avec UIP3.

3^{ème} période (12-18 mois) :

Suite de l'objectif 2 – Utilisation de mutations d'E6AP de patients pour sélectionner des cibles critiques

L'exploration de l'impact de ces trois mutations de E6AP sur l'interaction avec UIP3 a montré que la mutation E269G n'a pas ou peu d'effet sur l'interaction de E6AP avec UIP3 et UIP4, alors que la mutation L273R résulte en une perte partielle de l'interaction avec UIP3 (et UIP4), suggérant que cette mutation affecte le repliement et/ou la stabilité de la protéine. La mutation L273F entraîne une diminution de l'interaction de E6AP avec UIP3

(mais pas UIP4). Les 160 premiers acides aminés de la protéine UIP3 sont suffisants pour une interaction avec E6AP.

L'interaction entre E6AP et UIP3 conduit à la monoubiquitinylation de UIP3 complète, ce qui suggère que l'ubiquitinylation de UIP3 par E6AP n'a pas un rôle dans la dégradation de UIP3 par le protéasome. Cela confirme des données qui montraient que UIP3 n'était pas dégradée de façon dépendante de E6AP au sein de cellules humaines HEK293T. Les conséquences fonctionnelles de la monoubiquitinylation de UIP3 sont en cours d'investigation.

Objectif 3 – Caractérisation d'un activateur putatif d'E6AP

La fixation de UIP2 à E6AP requiert la région 358 à 396 de E6AP. Aucune mutation retrouvée chez les patients SA n'est présente dans cette région. Les auteurs ont montré en particulier que le motif LxxAA présent dans cette région était requis pour l'interaction. La surexpression de la protéine E6 du papillomavirus humain HPV (qui a donné son nom à la protéine E6AP/UBE3A) affecte l'interaction entre UIP2 et E6AP confirmant que le motif LxxAA (requis pour la fixation de E6 à E6AP) est impliqué dans l'interaction avec UIP2.

4^{ème} période (18-24 mois) :

Suite de l'objectif 3 – Caractérisation d'un activateur putatif d'E6AP

Les auteurs ont montré que la région 254-433 de la protéine UIP2 (qui fait 757 acides aminés) est requise pour l'interaction avec E6AP. Néanmoins une région plus grande (234-544) est nécessaire pour une interaction optimale. Une région de 59 acides aminés dans ce domaine (qui n'est pas présente chez les autres protéines de la même famille) est requise mais pas suffisante pour l'interaction avec E6AP.

La fixation de E6 à E6AP est requise pour stimuler l'activité d'autoubiquitinylation de E6AP. De la même façon, la co-expression de UIP2 et E6AP dans un système bactérien conduit à l'autoubiquitinylation de E6AP, ce qui montre que UIP2 est un activateur de E6AP (comme E6).

Résumé et perspectives futures

Ces travaux sont complémentaires de ceux du groupe Van Woerden/Elgersma.

Des 3 protéines étudiées (UIP2,3 et 4), seule UIP3 est une cible de E6AP qui se retrouve donc ubiquitinylée en présence de E6AP. Le rôle de cette modification post-traductionnelle de UIP3 reste à découvrir. UIP3 est une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire. Des études supplémentaires sont requises pour savoir en quoi son ubiquitinylation par E6AP peut moduler sa fonction. Une mutation faux-sens observée dans le cas d'une personne SA conduit à une perte d'interaction avec UIP3. Les conséquences d'une réduction de l'interaction avec UIP3 dans le cadre du syndrome SA sont en cours d'investigation.

L'étude de l'interaction entre UIP4 et E6AP a permis de décrire leur domaine d'interaction, et de montrer que UIP4 est requise pour l'interaction de E6AP avec le protéasome. Les auteurs préparent un manuscrit en collaboration avec le groupe Van Woerden/Elgersma sur les travaux de recherche portant sur UIP4.

Enfin, les auteurs ont montré que la protéine UIP2 interagit avec E6AP d'une manière analogue à la protéine E6 du virus HPV et que comme celle-ci elle est un activateur de l'autoubiquitinylation de E6AP. Cet effet n'a pas pu être observé au sein de cellules

humaines transfectées. Les auteurs indiquent qu'ils souhaitent approfondir ce point pour résoudre ce problème.

Les auteurs rappellent aussi, dans le résumé, les résultats qu'ils avaient obtenu concernant la protéine PML (qui est aussi une cible de E6AP). Ils signalent aussi qu'ils ont mis au point un nouveau système d'étude de l'ubiquitylation (non plus dans un modèle bactérien mais à présent dans un modèle eucaryote de type levure). Dans ce modèle, ils confirment que UIP3 est une cible de E6AP. Les auteurs ont un manuscrit en révision sur ce sujet (R. Avagliano Trezza *et al.* « A versatile plasmid system for reconstitution and analysis of mammalian ubiquitination cascades in yeast ». *Microbial Cell*).

Enfin, ils signalent les deux articles qu'ils comptent soumettre fin 2017 en collaboration avec le groupe Van Woerden/Elgersma :

- Les résultats combinés de ce groupe et de celui du Dr Distel sur l'interaction de la PML avec UBE3A et son rôle (ou son absence de rôle) dans le cadre du SA
- Les résultats combinés de ce groupe et de celui du Dr Distel sur la compréhension de la signification physiologique de l'interaction entre RPN10 et UBE3A.

Rapports traduits et résumés par Stéphanie Bury-Moné, Professeur de Microbiologie (Université Paris-Sud).