

Veille scientifique concernant le syndrome d'Angelman

Auteurs : Hélène LUBRANO DI SCAMPAMORTE, Sarah MANOURY, Laura FRIZZI et Lou CARLIER, étudiantes en Master de l'ENS Paris-Saclay

Relecture : Pr S. Bury-Moné, Université Paris-Saclay, Dr Sophie-Dorothée Montagutelli, pédiatre, pédiatre et Vice-Présidente de l'AFSA

Cette veille scientifique correspond à une sélection d'articles scientifiques parus entre avril 2020 et mai 2021. Elle est organisée en 3 parties :

- Articles de recherche fondamentale
- Articles de recherche préclinique, clinique et diagnostique
- Éléments concernant quelques essais cliniques

Le syndrome d'Angelman (SA) est une maladie neuro-génétique dont la prévalence varie entre 1 enfant sur 12000 et 1 enfant sur 20000. Cette maladie se caractérise par une déficience cognitive et motrice, une quasi-absence d'expression orale, des troubles de l'équilibre, un tremblement des membres, une épilepsie et des troubles du sommeil. Le SA est dû à une altération de l'expression du gène *UBE3A* maternel, localisé sur le chromosome 15, dans le cerveau. Comme il le sera expliqué au cours de la revue, l'expression *UBE3A* paternel est silencieuse au sein des neurones, comme chez tous les individus, phénomène appelé « empreinte parentale » (détaillé plus loin dans la revue, Figures 3, 4 et 9). Au sein de ces cellules, c'est donc le gène d'origine maternelle qui est exprimé. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la survenue du SA. Il peut s'agir :

- D'une délétion du gène *UBE3A* maternel dans 60 à 70 % des cas, c'est à dire une partie du gène manquante
- D'un défaut (mutation) de l'exemplaire d'origine d'*UBE3A* maternel dans 10 % des cas,
- D'une disomie parentale dans 2 à 5 % des cas, soit l'individu hérite deux fois du gène silencieux paternel *UBE3A*.
- D'un défaut d'expression du gène d'*UBE3A* maternel dans 2 à 5 % des cas, le gène est intact mais des marques en amont du gène ne permettent pas son expression
- D'une cause inconnue à ce jour dans 5 à 26% des cas

Ces altérations se produisent de manière aléatoire lors de la formation des cellules reproductrices ou au début du développement embryonnaire. Les personnes atteintes n'ont généralement pas d'antécédents familiaux de cette maladie. De plus, le sexe et l'origine ethnique n'interviennent pas dans le développement de cette maladie.

RECHERCHE FONDAMENTALE :

La recherche fondamentale a pour objet la compréhension fine et détaillée des organismes vivants (cellules, gènes...). Ces recherches ont pour objectif de mettre en lumière de nouveaux mécanismes, de nouvelles interactions entre des organismes. Ce sont ensuite les

acteurs de la recherche finalisée et du secteur Recherche & Développement des laboratoires qui s'appuient sur ces découvertes pour élaborer des stratégies thérapeutiques.

Pour éclairer notre compréhension du vivant, la science fondamentale s'effectue soit *in vitro*, sur des cellules en culture, soit *in vivo*, sur des organismes modèles. Lorsque cela est possible, les travaux *in vivo* sont préférable puisqu'ils permettent d'observer l'objet cible (une molécule particulière ou autre), son fonctionnement mais également ses interactions avec son environnement.

Dans le cas du SA, certains résultats fondamentaux que nous vous présentons ici ont été obtenus *in vivo* sur des souris atteintes de SA, par altération de leur génome. Les résultats obtenus chez les souris ne sont pas automatiquement généralisables car il existe des différences génétiques, comportementales et de fonctionnement entre la souris et l'humain. Les résultats présentés ci-dessous seront ainsi des pistes à explorer par la recherche appliquée.

Évaluation de la nécessité de l'expression pré-natale d'*UBE3A* pour restaurer des phénotypes comportementaux dans les souris modèles du syndrome d'Angelman. M. Sonzogni *et al.* (Septembre 2020), *Molecular Autism*.

<https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-020-00376-9>

Les auteurs de l'article cherchent à explorer de façon précise la période critique pendant laquelle il est intéressant de réactiver l'expression d'*UBE3A*. Ils démontrent que l'extinction de l'allèle paternel n'a pas lieu avant la première semaine après la naissance. Cela signifie que l'expression est bi-allélique jusqu'à la naissance. Cependant, au stade prénatal, éteindre l'expression de l'allèle paternel n'a pas d'effet sur le phénotype, suggérant qu'il existe un mécanisme qui permet d'augmenter l'expression de l'allèle maternel si l'allèle paternel n'est pas exprimé. En revanche, la disparition de l'allèle maternel cause une diminution de la quantité d'*UBE3A* et un phénotype SA, sans compensation par l'allèle paternel.

Les auteurs ont cherché à déterminer à nouveau la période appelée « fenêtre critique » pendant laquelle la réactivation de l'expression d'*UBE3A* permet de restaurer un phénotype comportemental sauvage. Ils ont observé que la restauration complète du phénotype sauvage est possible lorsque la réactivation d'*UBE3A* a lieu entre la dernière semaine de développement embryonnaire (avant la naissance) et avant P21 (21 jours après la naissance de la souris). Dans le cas d'une réactivation plus tardive d'*UBE3A*, le sauvetage du phénotype ne sera que partiel. La période critique pour une restauration complète du phénotype sauvage se situe entre P1 et P21 chez la souris.

Les récepteurs A2A à l'adénosine modulent la dépression à long-terme et les stratégies de mémoire chez les modèles murins du syndrome d'Angelman. A. Moreira-de-Sà *et al.* (Décembre 2020), *Neurobiology of Disease*

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996120304125?via%3Dihub>

Le récepteur A2A est un récepteur à l'adénosine qui peut avoir un impact dans le contrôle de la dépression neuronale à long terme. Celle-ci correspond à un type de plasticité synaptique, dont le déficit est constaté chez les souris modèles du SA.

La densité du récepteur A2A à l'adénosine dans l'hippocampe est plus élevée chez les souris modèles du SA. L'équipe a montré qu'il n'y avait pas de différence prononcée dans le déficit

de l'apprentissage et la mémoire spatiale entre les souris modèles du SA ou les souris phénotype sauvage, grâce à l'épreuve du labyrinthe aquatique de Morris (consistant à trouver une plateforme dans un cadran du labyrinthe). Cependant, les souris modèles du SA sont les seules à utiliser une stratégie de recherche ne dépendant pas de l'hippocampe (égocentriques). Lors d'un traitement par une molécule SCH58261, antagoniste du récepteur A2A, les souris modèles de SA retrouvent la capacité de recours à des stratégies dépendant de l'hippocampe (allocentriques) ; comme les souris saines qui, lors de l'entraînement dans le labyrinthe passent de stratégies égocentriques à allocentriques grâce au fonctionnement de l'hippocampe.

On sait par ailleurs que l'apprentissage (permettant le changement de stratégie) dépend du processus de plasticité synaptique tels que la LTD (dépression à long terme) et LTP (potentialisation à long terme). S'il n'y a pas de différence dans la LTP, la LTD est altérée chez les souris SA, comparé aux souris sauvages. Ce déficit de la LTD peut être dû à l'activité trop importante des récepteurs A2A, confirmé par le blocage de ces récepteurs par le traitement SCH58261 qui restaure la LTD. Les voies impliquées dans la signalisation A2AR, aboutissant à des symptômes du SA sont sûrement multiples mais encore peu connues. Dans l'ensemble, cette étude fournit les premières pistes de l'intérêt possible de cibler le récepteur A2A pour gérer les déficits d'apprentissage dans le SA.

L'identification de la protéine UBE3A dans le fluide cérébro-spinal et dans l'espace extracellulaire de l'hippocampe suggère une potentielle nouvelle fonction dans la plasticité synaptique. A. Dodge *et al.* (Janvier 2021), *Autism Research*

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aur.2475>

Les mécanismes liant UBE3A au SA restent toujours à établir. On sait qu'UBE3A a des rôles intracellulaires dont une contribution à la dégradation des protéines par le protéasome. Mais la littérature récente tend à montrer qu'UBE3A possède en fait de multiples partenaires exerçant divers rôles (trafic cellulaire, réplication de l'ADN...). Cet article tend à démontrer un nouveau rôle fonctionnel d'UBE3A, cette fois-ci en dehors des cellules.

En effet, les auteurs montrent qu'UBE3A est présente dans le fluide céphalo-rachidien (LCR) chez les rats au phénotype sauvage (WT), notamment au niveau de l'hippocampe (région qui joue un rôle dans l'apprentissage et la mémoire), ce qui n'est pas le cas chez les rats modèles du SA. Cette protéine garde son activité catalytique dans le LCR.

On sait également que l'expression du gène *UBE3A* est augmentée par les activités d'apprentissage et de mémoire. L'excrétion d'UBE3A active dans le LCR, et sa concentration dépendent donc de ces activités d'apprentissage et de mémoire et pourrait avoir un rôle fonctionnel dans ces capacités.

Ils ont également montré que cette protéine était présente chez les humains neuro-typiques. De plus, il serait possible qu'elle ne soit pas présente dans le LCR chez les personnes SA bien que la rareté des échantillons (due à la rareté du syndrome) ainsi que la contamination des échantillons de l'équipe ne permettent pas de le confirmer.

Ceci ouvre de nouvelles investigations concernant le rôle d'UBE3A et donc peut résulter en de nouvelles approches thérapeutiques (injection d'UBE3A).

La distribution subcellulaire conservée d'UBE3A entre l'humain et la souris est facilitée par des isoformes non-homologues. F. I. Zampeta *et al.* (Septembre 2020), *Human Molecular Genetics*.

<https://doi-org.insb.bib.cnrs.fr/10.1093/hmg/ddaa194>

doi: [10.1093/hmg/ddaa194](https://doi-org.insb.bib.cnrs.fr/10.1093/hmg/ddaa194)

Même s'il n'y a qu'un gène *UBE3A*, il peut y avoir production de plusieurs types de protéines à partir de celui-ci par un mécanisme appelé « épissage alternatif » (production de plusieurs types d'ARN codant la protéine UEB3A à partir du gène *UBE3A*). Ces protéines, très proches, sont appelées isoformes. Il en existe trois chez l'homme, deux chez la souris. Les trois isoformes de la protéine UBE3A chez l'homme contiennent une version complète et active de l'enzyme UBE3A, mais deux d'entre elles ont en plus une séquence au début de la protéine (appelée « N-terminal extension » ci-dessous, Figure 1).

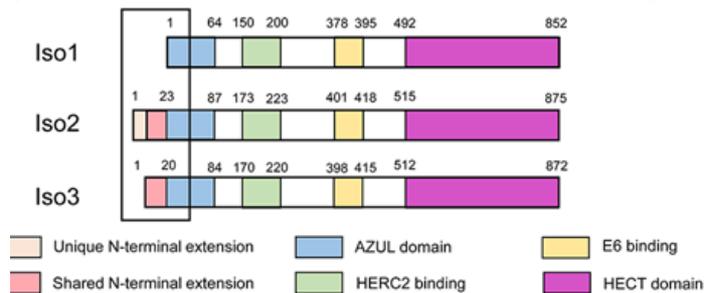


Figure 1 : Les isoformes de la protéine UBE3A humaine

D'après C. L Sirois *et al.* (Septembre 2020), *Human Molecular Genetics*.

Les isoformes hUBE3A-Iso1 et hUBE3A-Iso3 ont des homologues chez la souris, ce qui n'est pas le cas de hUBE3A-Iso2. Celle-dernière est étant apparue au cours de l'évolution des primates. Des isoformes de protéines peuvent avoir des abondances, fonctions et/ou localisations différentes, ce qui peut avoir des implications importantes dans le cadre de l'élaboration de stratégies thérapeutiques.

Dans un article antérieur (voir : <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa191> - Sirois *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 2020), les auteurs ont donc exploré cette question dans le cadre de l'étude des isoformes de la UBE3A humaine, appelées « hUBE3A-Iso1 », « hUBE3A-Iso2 » et « hUBE3A-Iso3 », exprimées par des cellules souches embryonnaires humaines (principal modèle d'étude de l'article). Ils montrent que hUBE3A-Iso1 est l'isoforme la plus abondante (env. 90 % de la quantité totale d'UBE3A) et que les trois isoformes sont localisées majoritairement dans le cytosol¹ (env. 70 %), le noyau (c'est-à-dire dans le compartiment qui contient l'ADN cellulaire) étant toutefois relativement enrichi/concentré en protéines UBE3A par rapport au cytosol.

Dans l'étude de Zampeta et collaborateurs, les auteurs mettent en œuvre des approches un peu différentes pour explorer la localisation des isoformes, et observent que hUBE3A-Iso1 et hUBE3A-Iso3 sont enrichies dans le noyau des cellules alors que l'isoforme hUBE3A-Iso2 (absente chez la souris) est localisée principalement dans le cytosol. Ces propriétés de localisation sont intrinsèques aux protéines et ne dépendent pas du type cellulaire utilisé pour réaliser les expériences. Il est à noter que hUBE3A-Iso1 a la même localisation que son homologue murin, alors que hUBE3-Iso3 est enrichie dans le noyau chez l'humain mais pas son homologue murin qui est lui plutôt localisé dans le cytosol.

La conservation de la localisation nucléaire dans l'évolution (humain *versus* souris) pour l'isoforme majoritaire (hUBE3A-Iso1) suggère que le(s) rôle(s) nucléaire(s) d'UBE3A sont

¹ Le cytosol correspond à la partie liquide du cytoplasme, dans laquelle baignent les constituants cellulaires appelés organites. Le cytoplasme désigne la partie de la cellule située entre la membrane plasmide de la cellule et le noyau.

probablement importants. Par ailleurs, ces résultats soulèvent la question du rôle du pool cytosolique d'UBE3A (homologue murin de hUBE3A-iso3 et isoforme hUBE3A-Iso2 chez l'humain).

La perte sélective de hUBE3A-Iso1 chez l'homme conduit à un SA dont le profil clinique est un peu atténué par rapport à celui des SA dus à des mutations (et d'autant plus à ceux liés à des délétions). Les auteurs en déduisent que même si hUBE3A-Iso1 est la forme majoritaire (et à ce titre occupe un rôle de premier plan), les isoformes hUBE3A-Iso2 et hUBE3A-Iso3 bien que relativement peu abondantes sont aussi très importantes d'un point de vue fonctionnel.

Cet article rappelle également que la souris reste un modèle qui peut présenter des différences notables avec l'être humain. Tout d'abord, comme indiqué plus haut, l'isoforme 2 humaine n'a pas son équivalent chez la souris. De plus, seule la perte de l'isoforme nucléaire cause le SA chez la souris de façon analogue à l'Homme. Bien qu'elles soient homologues, les localisations des isoformes hUBE3A-Iso3 et de son homologue murin ne sont pas les mêmes. Enfin, les isoformes de souris ne sont pas générées par épissage alternatif (production de plusieurs ARN différents par coupure-collage) mais principalement par traduction alternative (initiation de la traduction à sites différents d'un même ARN). Toutes ces données permettent de dire que le modèle murin est important et intéressant, mais doit être considéré avec prudence car il présente quelques différences au regard des mécanismes moléculaires qui donnent naissance au pool de protéine UBE3A et à leur localisation.

La PKA et UBE3A régulent le trafic des canaux SK2 pour promouvoir la plasticité synaptique dans l'hippocampe : Implications pour le syndrome d'Angelman. J. Sun *et al.* (2020), *Nature Scientific Reports*.

<https://www.nature.com/articles/s41598-020-66790-4>

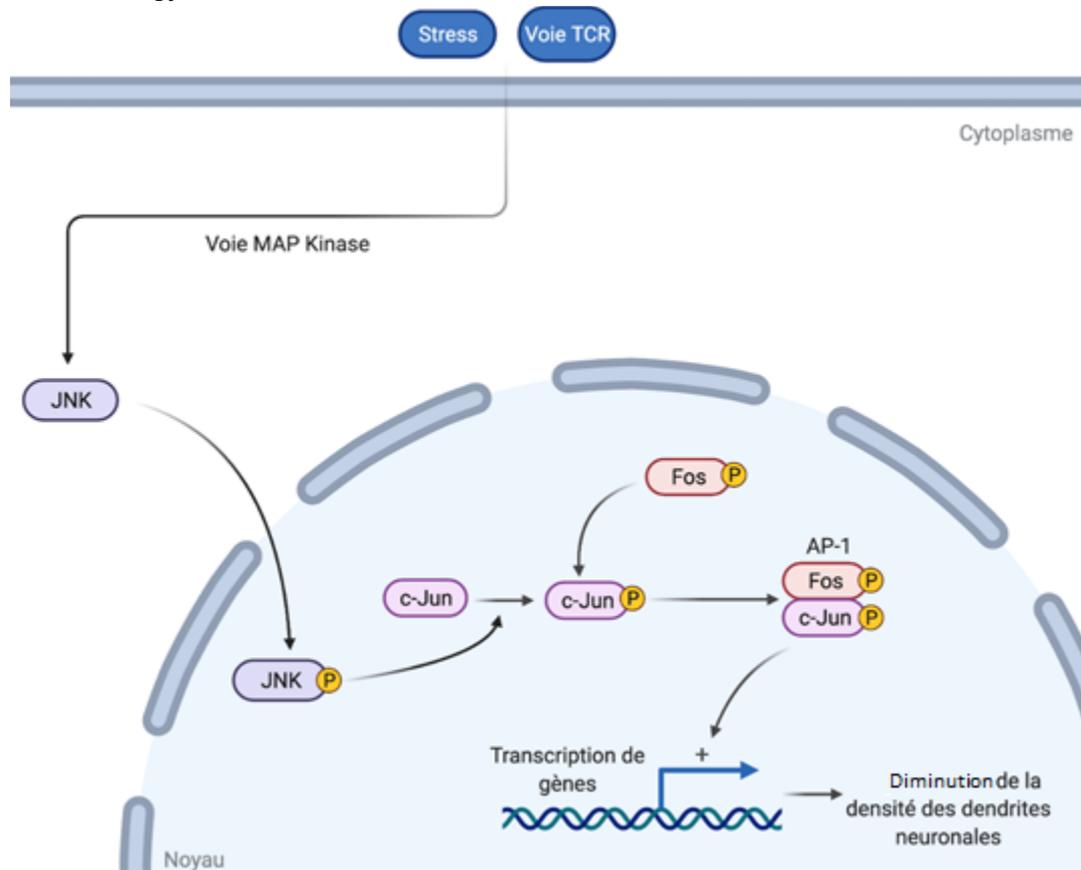
Le SA, caractérisé par une déficience de l'enzyme UBE3A, est à l'origine de troubles neurologiques variés tels des déficiences de l'apprentissage, la mémoire et les interactions sociales. La mémorisation et l'apprentissage dépendent de l'activité du canal SK2 qui régule les flux d'information dans le cerveau. En effet, il a été montré qu'une activité moindre de ce canal est associée à un meilleur apprentissage et une meilleure mémoire. D'autres études ont également mis en évidence le rôle négatif d'UBE3A sur la quantité de SK2 et donc cette diminution de SK2 est bénéfique pour les processus cognitifs.

S'il est bien établi que la déficience en UBE3A dans le cadre du SA est responsable de ces troubles neurologiques, il reste à comprendre l'action de cette dernière sur SK2. C'est logiquement la question qui a guidé les recherches des auteurs de cet article. Grâce à leur étude sur des modèles de souris, ils ont mis en lumière le rôle inhibiteur d'UBE3A dans le recyclage de SK2.

Pour mieux comprendre ce résultat, il nous faut expliciter ce qu'est le recyclage des composants cellulaires. Les canaux SK2 se situent dans la membrane (sur les bords) de la cellule, et lors de leur fin de vie chaque canal s'internalise (rentre vers le milieu de la cellule) afin d'être recyclé et réutilisé. Or nous avons vu précédemment que l'augmentation du nombre de canaux entraîne des difficultés de mémorisation et d'apprentissage. Donc si UBE3A n'inhibe pas le recyclage, l'augmentation du nombre de SK2 devient inévitable et génère donc ces problèmes cognitifs.

Un traitement diminuant les niveaux de SK2 pour pallier l'absence de UBE3A dans les cellules pourrait donc être une piste intéressante dans le traitement de certains symptômes du SA.

L'activation de la signalisation JNK dans les modèles murins déficients en UBE3A : son inhibition spécifique prévient l'altération des fractions enrichies en protéines et les déficits cognitifs dans le modèle du syndrome d'Angelman. C. A. Musi *et al.* (Juillet 2020), *Neurobiology of Disease*.



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996120300875?via%3Dihub>

Figure 2 : Signalisation JNK induite par le stress, impliquant le facteur c-Jun

La perte d'UBE3A entraîne à la fois une diminution de la densité des dendrites neuronales et une phosphorylation (modification qui module l'activité ou les interactions d'une protéine) de la protéine PSD95 qui a un rôle dans la localisation des récepteurs à la synapse. Ces deux phénomènes sont liés à une forte activité JNK (et par voie de conséquence du facteur de transcription c-Jun) en absence de UBE3A (Figure 2). Dans les processus neurodégénératifs, la forte activité de la voie JNK a une double conséquence : elle entraîne une forte phosphorylation du facteur de transcription c-Jun dans le noyau, activant ainsi le programme de mort neuronale, et phosphoryle PSD95, altérant les niveaux de certaines protéines présentes au niveau post-synaptique ainsi que la structure morphologique de l'élément postsynaptique. Le rôle de cette voie JNK n'avait pas été explorée dans le cadre du SA. Les auteurs ont donc mené des expériences pour savoir quel était le niveau d'activité de la voie JNK au sein du modèle murin du SA. Les souris modèles du SA sont associées à une forte activité JNK (surtout entre les 7^{ème} et 23^{ème} semaines post-partum) dans le cerveau, notamment dans l'hippocampe, le cortex ainsi que le cervelet. De plus, les auteurs montrent que l'inhibition, par D-JNK11, un peptide inhibiteur de JNK, de la voie JNK entraîne, chez les

modèles SA, une augmentation de la phosphorylation de c-Jun, ainsi qu'une phosphorylation accrue de PSD95.

Les auteurs concluent donc sur un rôle important de la protéine UBE3A qui interagit de façon directe ou indirecte avec JNK. De plus, les auteurs précisent que l'utilisation de l'inhibiteur D-JNK11 réduisant ces effets de la perte d'UBE3A et réduisant les troubles du comportement chez les souris modèles du SA, il constitue une piste thérapeutique à explorer.

Une variation génétique commune dans la région d'établissement de l'empreinte du syndrome d'Angelman affecte l'établissement de l'empreinte sur le chromosome 15.

J. Beygo *et al.* (Juin 2020), *European Journal of Human Genetics*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7253442/>

Dans 3 à 5% des patients atteints du SA, la maladie est due à un défaut d'établissement de l'empreinte parentale. En effet le gène *UBE3A*, situé sur le chromosome 15, est un gène soumis à empreinte parentale, c'est-à-dire que la copie du gène héritée du père et celle héritée de la mère ne sont pas exprimées de la même façon. Dans le cas du gène *UBE3A* la copie du gène paternel est éteinte et seule la copie maternelle permet l'expression du gène et de la protéine UBE3A dans les neurones [1]. Chez les patients dont la cause du SA est un défaut d'établissement de l'empreinte, le promoteur maternel *SNRPN* n'est pas méthylé correctement ce qui provoque l'expression du transcrit antisens de *UBE3A* sur l'allèle maternel (appelé *UBE3A-ATS* dans la figure 3 ci-dessous, d'une taille importante > 460 000 paires de bases chez l'Homme). L'expression du transcrit antisens induit une inhibition de l'expression du gène *UBE3A* maternel et donc de la protéine UBE3A. Comme la copie paternelle est éteinte, le gène n'est plus exprimé et la protéine UBE3A est absente.

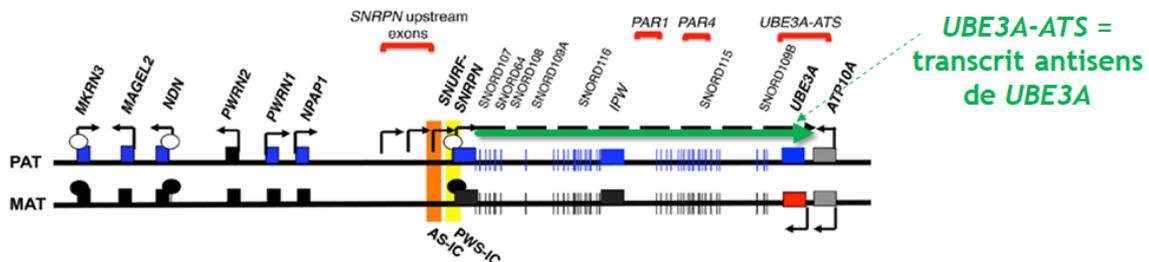


Figure 3 : Expression au sein des neurones de la région du chromosome contenant le gène *UBE3A*

Rectangles bleus = gènes exprimés à partir du chromosome paternel (« PAT ») ; Rectangles rouges = gènes exprimés à partir du chromosome maternel (« MAT ») ; Rectangles noirs = gènes dont l'expression est éteinte lorsque l'empreinte épigénétique est mise en place ; Rectangles gris = gènes qui ne sont pas soumis à empreinte épigénétique dans le type cellulaire présenté. PWS-IC (PWS pour *Prader-Willi*) et AS-IC (AS pour *Angelman Syndrome*) sont des centres de mise en place de l'empreinte parentale (IC pour *imprinting centre*). Les flèches indiquent le sens de la transcription. Adapté de : Tan & Bird, *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* (2016)

Dans les cas de SA lié à un défaut de mise en place de l'empreinte, ce défaut est le plus souvent causé par une délétion d'une région particulière, localisée en amont du promoteur *SNRPN*, appelée le centre d'empreinte du SA (AS-IC sur la figure 3, ci-dessus). Cette région est nécessaire pour que le promoteur *SNRPN* maternel soit méthylé et ainsi que la protéine

UBE3A provenant de la copie maternelle soit exprimée². Pourtant, il existe des cas de défaut de mise en place de l’empreinte pour lesquels aucune délétion (connue pour être délétère) dans cette région AS-IC n’est détectée. Les auteurs se sont intéressés à ces cas particuliers. Ainsi, ils ont séquencé 168 patients présentant un défaut de l’empreinte sans délétion apparente (déjà connue comme étant délétère) dans la région AS-IC. Ils ont observé l’existence de 6 variants communs dans cette région AS-IC chez ces patients. Un variant est une version d’un gène ou d’une région du génome qui diffère légèrement de la version “classique”. Ainsi les 6 variants du centre d’empreinte AS-IC repérés chez les patients n’ont pas exactement la même séquence : 5 présentent une variation dans la nature d’un nucléotide (SNP pour *single nucleotide polymorphism*), le 6^{ème} présente une très courte délétion de 4 pb (TATG). Ce dernier a été appelé « haplotype H-AS3 ». Les 5 SNP identifiés ne sont pas associés à un risque accru de transmettre le SA, et n’expliquent donc pas le défaut d’empreinte observé chez les patients (qui ne semblent donc avoir aucune mutation particulière dans la région AS-IC). Concernant le variant H-AS3 (comportant une courte délétion TATG), les auteurs ont observé qu’il est associé à un risque accru de transmettre le SA (analyse menée sur une cohorte de personnes SA présentant un défaut d’empreinte). Néanmoins, il convient de relever que compte tenu du fait que la fréquence de l’haplotype H-AS3 dans la population est de ~ 0,1 et que la prévalence à la naissance d’un enfant atteint d’un défaut d’empreinte générant un SA est < 1:1 000 000, le risque associé à cet haplotype est trop faible pour justifier un diagnostic prénatal.

Revue sur l’édition de l’épigénome grâce à l’outil CRISPR/Cas9 dans le cadre des pathologies rares concernant l’empreinte parentale. L. A. Syding *et al.* (2020), *Cells*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7226972/>

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, l’extinction du gène *UBE3A* paternel est dû à la présence du transcrit antisens de ce gène, appelé *UBE3A-ATS* (voir Figure 3).

L’expression du transcrit *UBE3A-ATS* à partir de la copie paternelle uniquement s’explique par un mécanisme épigénétique. L’épigénétique concerne les modifications d’expression des gènes qui ne sont pas liées à une modification de la séquence de l’ADN en elle-même. La méthylation de l’ADN est notamment une marque épigénétique, il s’agit de l’ajout d’un groupement chimique sur l’ADN qui va réduire son accessibilité aux protéines. Quand l’ADN est peu accessible, l’information qu’il code est peu « lue » par les machines cellulaires, il y a donc peu d’expression du gène, c’est-à-dire de production d’ARN (phénomène appelé « transcription ») qui seront eux-mêmes décodés pour produire des protéines (phénomène appelé « traduction »). Ainsi, la méthylation de l’ADN permet de réprimer l’expression d’un gène comme illustré ci-dessous (Figure 4).

² Il est à noter que le gène *UBE3A* s’exprime à partir des deux allèles parentaux dans les autres types cellulaires.

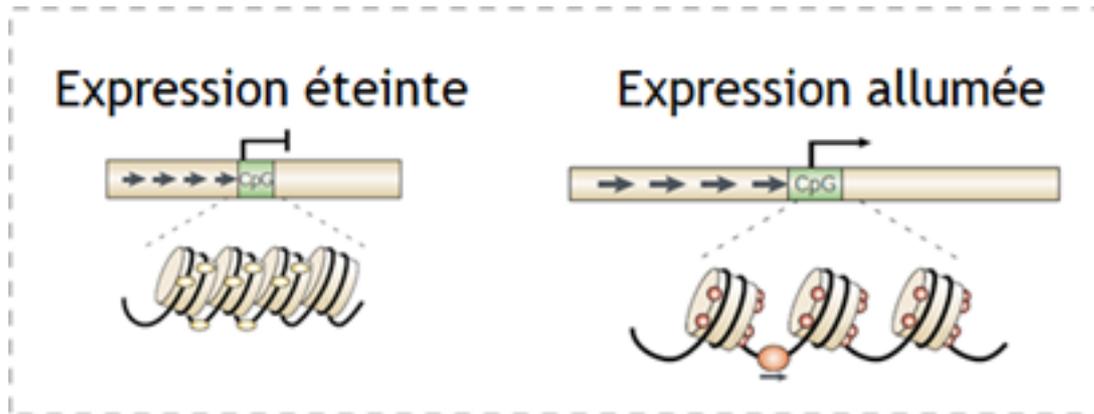


Figure 4 : Représentation du lien entre modification épigénétique et expression de l'ADN.

L'ajout de groupements méthyles (représentés dans des ovaux jaunes) sur les bases de l'ADN entraîne notamment sa compaction. Dans ces conditions, l'ADN est moins accessible à la machinerie cellulaire et se trouve donc moins exprimé. Les îlots CpG sont des régions de l'ADN qui sont susceptibles d'être très méthylées. Adapté de Wikiwand; Reik & Walter, *Nature Reviews Genetics* (2001).

Sur le chromosome paternel, il y a une hypométhylation du site de démarrage de la transcription (TSS) du long ARN non-codant *UBE3A-ATS*. Cette déficience en méthylation au niveau du TSS d'*UBE3A-ATS* paternel permet son expression et ainsi la répression du gène *UBE3A* paternel (voir Figure 3). Par opposition, le TSS d'*UBE3A-ATS* au niveau de la copie maternelle est hyperméthylé, réprimant son expression et l'empêchant d'inhiber la copie maternelle d'*UBE3A*. Du fait de la déficience de l'expression maternelle du gène *UBE3A* dans le SA, il pourrait être très intéressant de forcer l'expression de la copie paternelle du gène.

Une stratégie a été mise au point très récemment sur la base du système CRISPR-Cas9 (dont la découverte a été récompensée par le prix Nobel de chimie en 2020). Celle-ci repose sur l'utilisation d'une forme très modifiée de l'enzyme Cas9 qui ne coupe alors plus l'ADN mais devient capable de le méthyler. Ce système conserve la capacité de ciblage spécifique des modifications. L'idée consisterait donc à induire la méthylation de l'ADN au niveau d'un site précis du génome, et donc dans le cas présent, au niveau du TSS d'*UBE3A-ATS* paternel. L'objectif d'une telle stratégie serait donc d'empêcher l'expression d'*UBE3A-ATS* au niveau du gène paternel, et ainsi d'induire l'expression de la copie paternelle d'*UBE3A*, afin d'améliorer les symptômes du SA.

L'avantage de cette stratégie par rapport à d'autres visant aussi à induire une activation de l'expression de l'allèle *UBE3A* paternel, est qu'elle est spécifique et donc moins toxique que certains traitements testés précédemment, tels que le topotecan (un inhibiteur de la topoisomérase 1). En effet, moins une stratégie est spécifique, plus elle atteindra des cibles nombreuses au sein de la cellule. Or, dans le cas du topotecan, la perturbation de l'expression de gènes hors-cible (ne correspondant pas à *UBE3A*), est responsable de toxicités, d'où l'intérêt de développer des stratégies alternatives plus spécifiques. De plus, à la différence des oligonucléotides antisens étudiés en clinique aujourd'hui dont l'action est transitoire, la stratégie basée sur la méthylation spécifique médié par un système CRISPR-Cas9 modifié permet une expression durable dans le temps du transcrit *UBE3A* paternel. En effet, la

méthylation apposée au TSS d'*UBE3A-ATS* par ce système sera maintenue par les protéines DNMT1 dans les cellules filles des cellules modifiées, après chaque division cellulaire, au même titre que les autres méthylations de l'ADN. L'utilisation d'une approche basée sur l'utilisation d'une version modifiée de CRISPR-Cas9 permettant de méthylater spécifiquement le TSS d'*UBE3A-ATS* paternel constitue donc une piste de recherche intéressante à explorer.

Recherche préclinique, clinique et diagnostique

La recherche fondamentale peut amener les chercheurs à des idées de traitements et de procédés diagnostiques. Les molécules et les procédés sont ensuite soumis à une recherche préclinique (sur des modèles murins en général, qui fournit une preuve de concept) et/ou clinique (en général sur des cohortes de patients à base d'observations et de questionnaires). *In fine*, ces recherches visent à passer en essai clinique ou à faire valider des concepts diagnostiques.

RECHERCHE PRÉCLINIQUE, CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE :

CRISPR/Cas9 dirigé vers le transcrit antisens *UBE3A-ATS* améliore le phénotype du syndrome d'Angelman chez la souris. R. S. Schmid *et al.* (Janvier 2021), *The Journal of Clinical Investigation*.

<https://www.jci.org/articles/view/142574>

Comme expliqué précédemment, les patients atteints du SA ont une déficience de l'expression maternelle du gène *UBE3A* et ont, comme tout le monde, une copie paternelle du gène *UBE3A* silencieuse malgré le fait qu'elle soit intacte. L'absence de l'expression paternelle d'*UBE3A* s'explique par la transcription inverse simultanée de ce gène (appelé anti-sens *UBE3A-ATS*), bloquant ainsi le chemin de transcription et indirectement de la production de *UBE3A* paternel (Figure 3). Intuitivement il paraîtrait intéressant d'induire, chez les patients atteints du SA, l'expression d'*UBE3A* paternel pour compenser la déficience du gène maternel.

C'est ce que les auteurs de cette étude ont cherché à confirmer. Ils ont tenté de développer une approche thérapeutique permettant l'inhibition de ce transcrits anti-sens, ce qui favoriserait ainsi l'expression *UBE3A* paternel. Pour cela, ils ont utilisé la méthode qui a récemment révolutionné la génétique : la méthode CRISPR. Cette méthode permet d'agir comme un ciseau en coupant le génome à un endroit précis, pour modifier la séquence génétique de l'anti-sens d'*UBE3A* paternel. Dans le cadre de cette approche, la réparation de la cassure de l'ADN engendrée par Cas9 s'effectue sans que la cellule dispose d'un ADN modèle à recopier pour bien réparer. Les auteurs ont observé que cela conduit à une insertion/délétion de quelques paires de bases dans la région ciblée dans 14.7 % (8.6 %–21.7 %) des cellules du cerveau des souris ayant reçu le traitement peu après leur naissance.

Les résultats furent concluants et ont confirmé l'intuition de départ puisque l'ajout, chez des souris à 14 jours d'âge, d'une séquence en amont de cet anti-sens par CRISPR a permis l'expression de *UBE3A* paternel. Une réduction des symptômes neurologiques a été constatée à la suite de ce traitement. Cette thérapie semble donc prometteuse quant à son efficacité et sa méthode. En effet, la modification du génome, une fois réalisée, ne nécessite plus d'intrant régulier (médicaments...) pour le patient. Cependant le chemin est encore long avant de voir cette révolution scientifique intégrer les thérapeutiques du SA car d'une part de

nombreuses autres études seront nécessaires pour confirmer l'apport bénéfique de cette thérapie et d'autre part la technique CRISPR, parce qu'elle touche directement au génome, doit encore gagner en fiabilité.

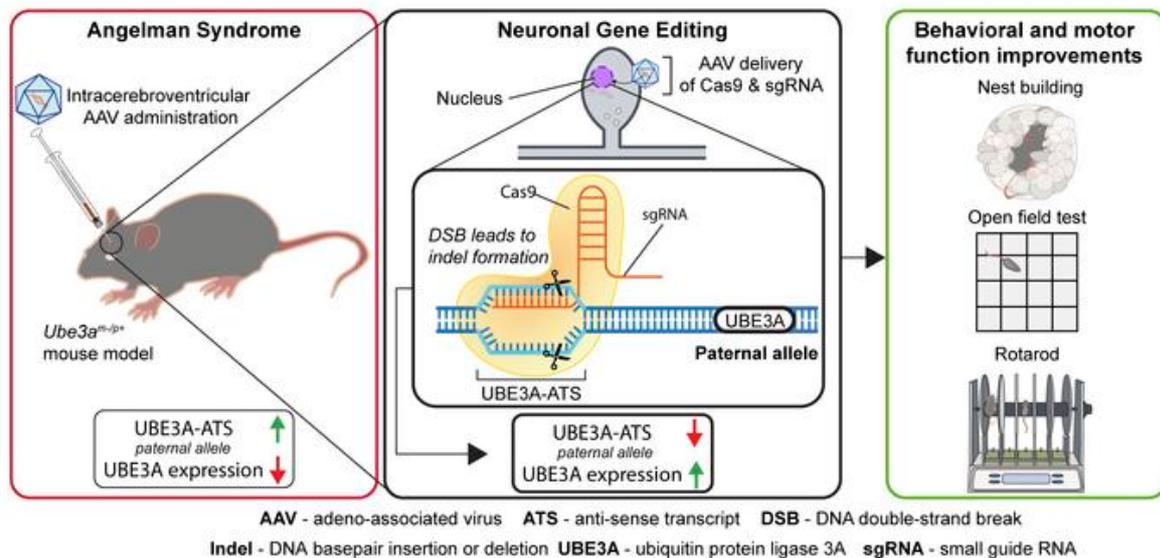


Figure 5 : Résumé graphique de l'approche d'édition du génome ciblant UBE3A-ATS
D'après Schmid *et al.* 2021

Une thérapie génique à l'aide de Cas9 afin de réprimer le long ARN non-codant *UBE3A-ATS* dans le cadre du Syndrome d'Angelman. J. M. Wolter *et al.* (Octobre 2020), *Nature*.
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2835-2>

Comme expliqué précédemment, l'inactivation du long ARN non-codant *UBE3A-ATS* peut permettre une réexpression de la copie paternelle du gène *UBE3A* qui pourrait permettre de compenser la déficience d'*UBE3A* maternel et améliorer les symptômes du SA. Plusieurs équipes tentent d'y parvenir le plus efficacement possible et plusieurs stratégies ont été testées dans cet objectif.

Dans cette étude, les chercheurs ont encore une fois utilisé le système CRISPR-Cas9 afin d'inactiver *UBE3A-ATS*. Cependant, ce système se base sur les mécanismes de réparations mis en place au sein de la cellule cible après la coupure ciblée induite par la protéine Cas9. Ainsi, selon le locus ciblé au sein des séquences d'*UBE3A-ATS*, la cellule ne mettra pas en place les mêmes mécanismes de réparation. La différence entre ces deux stratégies est que précédemment, le site ciblé induisait une réparation de l'ADN responsables d'insertions au sein de la séquence cible. Ici, le site ciblé étant au niveau de régions répétées de l'ADN, la réparation qui s'en suit induit des délétions au sein des séquences d'*UBE3A-ATS*.

Les chercheurs ont en effet utilisé le système CRISPR-Cas9 afin de cibler précisément les gènes *Snord115* qui sont présents dans la région 3' du gène codant *UBE3A-ATS*. Ce système a été utilisé afin d'induire leur délétion qui est couplée à une perte d'activation de l'expression de *UBE3A-ATS*. Conjointement à cette perte d'expression d'*UBE3A-ATS*, les chercheurs ont observé une augmentation de l'activation d'*UBE3A* paternel.

Cette inactivation du long ARN non codant a ici été réalisée chez des souris gestantes, pendant les stades embryonnaires majoritairement, donc avant la naissance des souriceaux SA. Après ce traitement, qui se fait en une seule injection, les souris SA ont été étudiées et il

a été observé une forte diminution d'un grand nombre de symptômes associés au SA, notamment le déficit moteur (le déficit cognitif n'ayant pas été observé chez ces souris SA, l'une des limites de ce modèle murin).

Cette restauration de phénotypes chez des souris SA a été maintenue durant la vie des souris, ainsi que l'expression du gène *UBE3A* paternel (pendant au moins 17 mois pour une espérance de vie de 24 mois). Cependant, l'un des inconvénients de cette stratégie est qu'elle a été mise en place avant la naissance des individus et que des thérapies géniques *in utero* sont compliquées à mettre en place (et nécessitent un diagnostic prénatal du SA). Cette fenêtre thérapeutique avait en effet été définie comme la plus efficace en termes de réactivation d'*UBE3A* afin d'améliorer les symptômes du SA. Néanmoins, d'autres stratégies ainsi que celles-ci doivent être testées à des stades plus tardifs afin de tester leur efficacité dans un contexte plus proche du cadre clinique réel du SA.

Évaluation de l'effet de l'agoniste de TrkB sur l'apprentissage moteur et spatial dans le modèle murin *UBE3A* du syndrome d'Angelman. M. N. Schultz et J. N. Crawley (Septembre 2020), *Learning Memory*.

doi: 10.1101/lm.051201.119

learnmem.cshlp.org/content/27/9/346

Le TrkB est le récepteur tyrosine kinase B. C'est un récepteur pour des facteurs de croissance appelés neurotrophines qui permettent entre autres la différenciation des neurones, leur survie ainsi que la plasticité cérébrale.

Les auteurs se sont intéressés à un agoniste de TrkB appelé 7,8-DHF ayant un fort potentiel thérapeutique pour les troubles neuro-développementaux. Dans l'étude, les auteurs montrent que cet agoniste, avec les protocoles utilisés, ne permet pas d'améliorer les symptômes neuro-développementaux chez des souris SA adultes. Cependant, les auteurs précisent que d'autres doses et fréquences doivent être testées avant d'abandonner la molécule, qu'il serait nécessaire de procéder au traitement chez des souris plus jeunes, bien que la recherche de traitement chez les adultes soit particulièrement intéressante afin d'améliorer leur qualité de vie.

Enfin, les auteurs précisent que les déficits moteurs particulièrement présents et persistants chez les souris adultes doivent être pris en compte dans les essais précliniques afin de réellement améliorer les symptômes chez les adultes.

Restauration fonctionnelle des phénotypes dans un modèle du syndrome d'Angelman après traitement par des cellules souches hématopoïétiques transduites par un lentivecteur. A. Adhikari *et al.* (Avril 2021), *Human Molecular Genetics*.

<https://academic.oup.com/hmg/advance-article/doi/10.1093/hmg/ddab104/6226239>

Une nouvelle approche développée par cette équipe de chercheurs comme traitement pour le SA est basée sur une thérapie génique utilisant des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules qui se renouvellent sans cesse et qui sont à l'origine des différentes cellules du sang (globule rouge, globule blanc, plaquettes). Le principe de cette thérapie consiste à modifier les cellules souches hématopoïétiques du patient atteint du SA pour qu'elles expriment une protéine *UBE3A* fonctionnelle, grâce à l'utilisation d'un vecteur lentiviral. Les vecteurs lentiviraux sont dérivés de virus, mais sont

rendus inoffensifs (c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas se multiplier). Les vecteurs lentiviraux infectent les cellules souches hématopoïétiques et y livrent leur ADN, contenant le gène codant pour la protéine UBE3A fonctionnelle, qui est intégré au génome de la cellule. Ces cellules du patient ainsi modifiées seraient ensuite réimplantées chez le patient. Une fois réimplantées, elles produiraient des cellules filles exprimant la protéine UBE3A fonctionnelle. Ces cellules filles seraient capables de migrer au niveau du cerveau et de fournir une protéine UBE3A fonctionnelle aux neurones déficients par un mécanisme encore peu connu appelé "cross correction" (correction croisée). Il est possible que les cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées se différencient en macrophages et en microglies et remplacent une partie de la population de macrophages et de microglies du système nerveux central. Il est également possible que les cellules greffées sécrètent la protéine UBE3A fonctionnelle après migration au niveau du cerveau. Ces points nécessitent encore d'être éclaircis. Le phénomène de migration des cellules dérivées des cellules souches hématopoïétiques vers le cerveau est également peu compris pour le moment mais ce phénomène est beaucoup étudié.

Afin de tester cette stratégie, les chercheurs ont dans un premier temps généré un vecteur lentiviral permettant l'expression de la protéine UBE3A fonctionnelle. Ils ont mis des cellules souches hématopoïétiques humaines en contact avec ce vecteur. Cela permet l'intégration du gène codant pour la protéine UBE3A, porté par le vecteur lentiviral, dans le génome des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches ainsi modifiées ont été transplantées chez des souris atteintes du SA. Après transplantation, la protéine UBE3A a bien été détectée dans les cerveaux des souris. De plus, une amélioration des comportements moteur et cognitif ont été observés chez les souris. Ainsi ce type d'approche pourrait être prometteuse afin de traiter le SA.

Les ligands des récepteurs CIM6P/IGF-2 inversent les déficits des souris modèles du syndrome d'Angelman. E. Cruz *et al.* (Octobre 2020), *Autism Research*.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/aur.2418>

Le SA est une maladie génétique qui affecte principalement le système nerveux impliquant notamment un retard du développement, un dysfonctionnement moteur, un manque de langage, des troubles du sommeil et des crises d'épilepsie. Nous savons désormais que ces symptômes proviennent en partie d'une altération de la capacité du cerveau à remodeler ces connexions en fonction de l'environnement, appelé plasticité cérébrale. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement pour combler ces déficits mais des pistes prometteuses sont explorées, comme celle présentée ci-dessous.

Les recherches en neuroscience ont permis de mettre en lumière l'implication, chez les rats et les souris, de plusieurs molécules dans cette plasticité et notamment celle qui nous intéresse ici, IGF-2 (*insulin-like growth factor 2*, aussi appelée somatomédine A), qui se fixe aux récepteurs CIM6P/IGF-2R (*cation-independent mannose-6-phosphate/IGF-2 receptors*). L'IGF-2 est une hormone peptidique, sécrétée principalement par le foie, présentant des similarités structurelles avec l'insuline. Lorsque cette hormone entre en action, elle agit alors comme le premier domino d'une série permettant le mécanisme de plasticité cérébrale. Cette réaction en chaîne est appelée voie de signalisation.

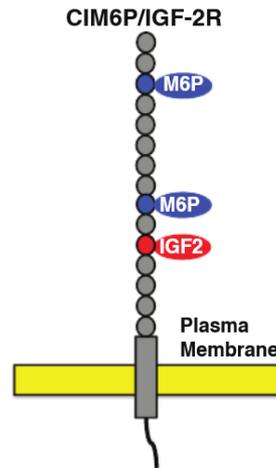


Figure 6 : Le récepteur CIM6P/IGF-2 et ses ligands.
D'après Cruz et al., Oct. 2020

A la suite de ces découvertes, des résultats probants ont été obtenus chez des souris autistes sur la mémoire, la plasticité et les déficiences cognitives et sociales en activant cette voie. Les auteurs de l'article qui nous intéresse ici se sont questionnés sur l'impact thérapeutique de ce traitement appliqué au SA. Leurs expérimentations, réalisées sur des souris atteintes de SA, ont abouti à des résultats similaires puisqu'ils ont constaté une amélioration de la déficience cognitive, motrice ainsi qu'une diminution des crises associées au SA. Ils ont déterminé que les doses efficaces chez la souris étaient de 30 µg/kg d'IGF-2 et de 850 µg/kg de M6P, injectées 20 min avant les tests. Ces données de laboratoire (précliniques) confortent l'idée que le ciblage de cette voie est une approche prometteuse qui ouvre les portes à de futures expérimentations chez l'homme.

Les organoïdes : modèle de recherche préclinique

Le développement d'organoïdes cérébraux humains révèle la dynamique spatiotemporelle précoce et les réponses pharmacologiques d'UBE3A. D. Sen et al. (Novembre 2020), *Stem cell report*.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213671120303374?via%3Dihub>

Les organoïdes correspondent à de mini organes et permettent l'étude de certaines pathologies en utilisant des cellules humaines. Ceux-ci peuvent en effet être générés à partir d'iPSC, des cellules souches pluripotentes qui peuvent être obtenues très facilement aujourd'hui, à partir de cellules de la peau de patients. Les organoïdes cérébraux sont particulièrement utiles étant donné l'inaccessibilité du cerveau chez des patients vivants, et la complexité du cerveau humain par rapport aux modèles animaux utilisés. Par ailleurs, dans le cadre du SA, la dynamique d'expression spatio-temporelle de la protéine UBE3A semble être capitale et sa perturbation semble jouer un rôle fondamental dans le développement du SA. La cinétique d'expression du gène *UBE3A* et l'apposition de l'empreinte parentale sont cependant très difficiles à étudier, puisqu'ils ont lieu pendant la période prénatale principalement. Ces éléments ne sont aujourd'hui pas connus sur des modèles humains et de telles informations pourraient s'avérer capitales dans le développement de futures éventuelles thérapies. Ainsi, le développement d'organoïdes cérébraux dérivés de cellules de patients SA

pourrait être très prometteur, tant dans un contexte de recherche fondamentale sur ce syndrome qu'en tant que modèle préclinique afin de tester des molécules thérapeutiques.

Dans le cadre d'études résumées dans cette revue, des organoïdes cérébraux ont été générés à partir d'iPSC de patients sains ainsi que de patients SA, afin de comparer le développement de ces mini cerveaux. En effet, il est possible d'étudier le développement de tissus à l'aide de cet outil. Ainsi, il a été observé que l'expression d'*UBE3A* dans le noyau de neurones augmente considérablement après 3 semaines de culture dans des organoïdes sauvages (générés à partir de cellules de patients sains). Au niveau des organoïdes générés à partir des cellules de patients SA, nous pouvons observer l'extinction précoce du gène *UBE3A* paternel, suite à l'apposition de l'empreinte parentale, comme attendu. Ces organoïdes cérébraux semblent donc être de bons modèles précliniques humains du SA. Il a également été possible de ré-induire l'expression d'*UBE3A* paternel au niveau de ces organoïdes à l'aide d'inhibiteurs de topoisomérases. Pour rappel, cette stratégie a été testée préalablement mais n'est pas utilisable en clinique car ces molécules ne sont pas assez spécifiques et induisent ainsi une forte toxicité. Cependant, ceci conforte la possibilité d'utilisation de cet outil afin de tester d'éventuelles molécules thérapeutiques.

Ainsi, le développement de ces organoïdes cérébraux est très prometteur afin d'apporter des réponses concernant le développement du cerveau humain avant la naissance, la différence avec les cerveaux de patients SA et ce à l'échelle cellulaire, subcellulaire et moléculaire. En effet, ces organoïdes cérébraux ont permis d'identifier les perturbations d'expression mais également de localisation subcellulaire de la protéine *UBE3A* au cours du développement, la dynamique au cours de laquelle ces perturbations ont lieu ainsi que l'apposition de l'empreinte parentale. Par ailleurs, les effets de traitements visant à réactiver *UBE3A* paternel, tels que le topotecan, ont pu être étudiés à ces échelles et apporter des informations très pertinentes, notamment en termes de fonctionnalité des neurones. Ces organoïdes cérébraux pourraient donc être un outil puissant afin de tester avec une plus grande proximité de la physiologie humaine d'éventuels traitements contre le SA, et ainsi d'éventuellement améliorer les résultats cliniques des traitements ainsi définis en préclinique.

Résumé d'une revue : Le rétablissement d'*UBE3A* utilisé comme thérapie modificatrice de la maladie pour le syndrome d'Angelman. Y. Elgersma et M. Sonzogni (Février 2021), *Developmental Medicine and Child Neurology*.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dmnc.14831>

UBE3A est une ubiquitine ligase, cependant, très peu de ses partenaires ont été décrit comme étant des partenaires directs. Le fait que le mécanisme d'action de *UBE3A* soit si global et semble affecter de nombreuses voies peut expliquer que les molécules thérapeutiques avec un champ d'action global soient les plus efficaces en essais précliniques. Cependant, ces molécules ne sont généralement pas efficaces par la suite, lors des essais cliniques, puisque l'on utilise généralement en préclinique des souris modèles délétées du gène *UBE3A*. En revanche, chez l'Homme, il existe quatre causes génétiques au SA (Figure 7), la plus fréquente (environ 70% des cas) étant la délétion maternelle de toute la région 15q11.2-q13 contenant *UBE3A* et non pas la délétion du gène seul comme chez les modèles. Il est donc important de rappeler que la souris SA reste un modèle et que les succès en essais précliniques peuvent ne pas donner des résultats en essais cliniques du fait du nombre limité de souris utilisées, de la différence des tests cognitifs mais également et surtout, des caractéristiques du modèle.

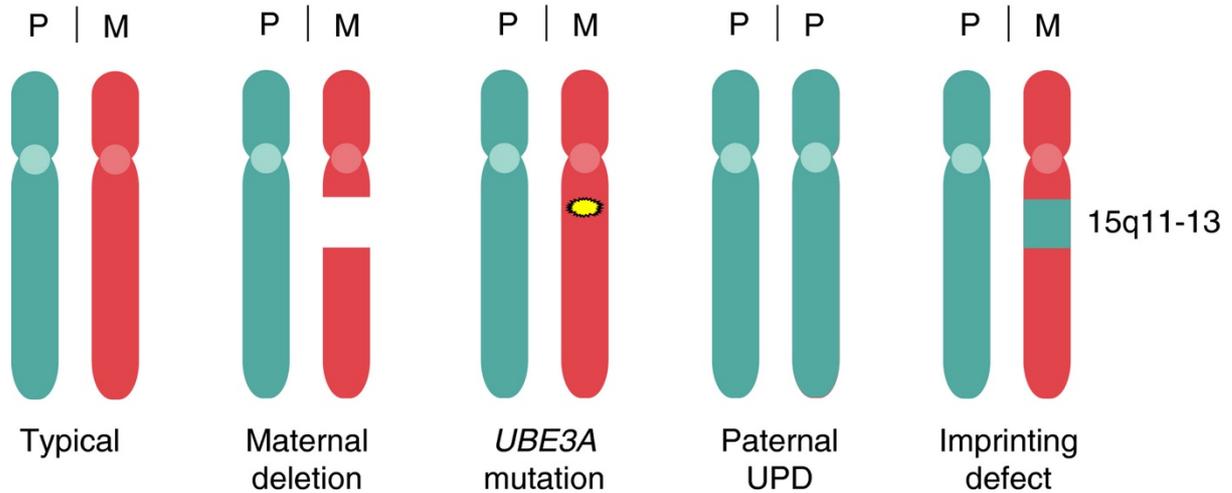


Figure 7 : Causes génétique du SA.

D'après Y. Elgersma et M. Sonzogni, Feb. 2020

Représentation de l'allèle paternel (P) et maternel (M) en comparant les individus neurotypiques (typical) aux quatre causes génétiques du SA. En vert les parties à empreinte, silencieuses, en rouge les parties non silencieuses.

Une alternative prometteuse à ces molécules serait alors le rétablissement de l'expression d'*UBE3A*. Ceci peut se faire par deux moyens : une thérapie génique pour introduire la protéine *UBE3A* dans le cerveau grâce à des vecteurs viraux ou par l'activation de l'allèle *UBE3A* paternel silencieux.

Bien que l'apport d'*UBE3A* par un vecteur viral se soit montré partiellement efficace chez les souris SA, il présente des défis : créer un vecteur viral sûr (ne provoquant pas de pathologie) avec une distribution de la bonne quantité d'*UBE3A* par cellule (au risque d'avoir des effets négatifs) et exprimant au moins les deux isoformes humaines dominantes de la protéine *UBE3A*.

Une autre solution plus élégante serait alors l'activation de l'allèle *UBE3A* paternel (voir Figure 3). Ceci peut se faire en interférant avec la synthèse du long ARN anti-sens *UBE3A-ATS* responsable de l'inactivation de l'allèle paternel. L'interférence avec *UBE3A-ATS* peut se faire grâce à des inhibiteurs de topoisomérase (une enzyme permettant de dérouler la molécule d'ADN pendant la transcription), grâce au système CRISPR-Cas9 (voir la partie Recherche Préclinique de la veille) ou grâce à des oligonucléotides antisens (ASO) qui forment un complexe avec *UBE3A-ATS* entraînant sa dégradation.

La thérapie avec les ASO s'avère prometteuse pour le SA car elle résout les problèmes rencontrés avec un vecteur viral et car les ASO sont rapidement absorbés par les neurones. Cependant, le traitement avec les ASO sur les souris n'a pas montré de grande amélioration des symptômes du SA, ce qui est sûrement dû à la période critique de restauration du phénotype sauvage (voir Sonzogni *et al.* dans la veille) ainsi qu'aux limites du modèle murin et au fait que le long ARN non-codant *UBE3A-ATS* soit peu conservé entre l'Homme et les souris. Les études cliniques de ces thérapies avec les ASO nécessitent donc la génération de nouveaux modèles humains avec les cellules souches pluripotentes induites (iPSC pour *induced pluripotent stem cells* qui sont des cellules capables de donner tous les types cellulaires de l'organisme) afin de déterminer les ASO efficaces.

Dans la suite de la veille, dans la partie Essais Cliniques, les différents essais en cours reposant sur l'utilisation d'ASO seront détaillés.

Recherche clinique sur le sommeil :

Le syndrome d'Angelman et la mélatonine : que peuvent-ils nous apprendre sur la régulation du sommeil ? D. Buonfiglio *et al.* (Septembre 2020), *Journal of Pineal Research*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12697>

70 à 80% des personnes atteintes du SA présentent des troubles du sommeil. Dans cette revue, les auteurs ont cherché à comprendre les causes possibles de cette dérégulation du sommeil en synthétisant plusieurs résultats précliniques (sur des souris) et cliniques (en condition réelle). Le sommeil de chacun d'entre nous est régulé par le processus circadien et homéostatique. Le rythme du cycle éveil-sommeil, régulé par le processus circadien, permet de positionner au cours de la journée les moments favorables à l'éveil et au sommeil. Par exemple, la mélatonine, hormone impliquée dans cette horloge, est synthétisée la nuit en absence de lumière et aide à l'endormissement. Le processus homéostatique quant à lui, reflète l'accumulation au cours de la période d'éveil d'un besoin de sommeil. Il augmente ainsi exponentiellement au cours de l'éveil et diminue durant le sommeil. La nature de ce processus est cependant très incomprise. Des cycles veille-sommeil anormaux et une diminution du besoin de sommeil sont associés aux patients atteints du SA.

Les patients atteints de ce syndrome ont donc un sommeil fragmenté, une durée de sommeil inférieure à la normale ainsi que de faibles niveaux de mélatonine sécrétés durant la journée autant chez l'enfant que chez l'adulte. Les études montrent que la réduction du niveau de mélatonine contribue aux problèmes de sommeil des personnes atteintes puisque des essais ont mis en évidence l'amélioration du sommeil et de l'attention des patients grâce à un traitement à la mélatonine en soirée. Cela suggère une implication du rythme circadien dans ces troubles. Des essais réalisés sur les souris ont suggéré également une implication du processus homéostatique. En effet, des études sont venues confirmer ces hypothèses en décelant chez les patients atteint du SA d'autres troubles du sommeil tels qu'une diminution du besoin de sommeil, suggérant un déficit du processus homéostatique.

Les auteurs ont renforcé l'hypothèse d'une implication des deux processus dans le dérèglement du sommeil des patients atteints du SA. Cependant, seule une augmentation des échantillons de patients et la réplification des résultats par plusieurs équipes de chercheurs permettra une compréhension plus fine pour qu'un meilleur sommeil ne soit plus un rêve.

Diagnostic :

Dépistage prénatal non invasif (DPNI) par séquençage génomique à faible couverture : Limites de détection des micro-délétions chromosomiques. M. Kucharik *et al.* (Août 2020), *PLOS One*.

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238245>

Ces dernières années, des études ont été menées afin d'effectuer des diagnostics prénataux plus sûrs, permettant d'avoir accès au bagage génétique du fœtus tout en étant associés à un faible risque d'engendrer une fausse couche. L'ADN fœtal circulant correspond à de l'ADN appartenant au fœtus qui passe dans le sang de la mère par le biais du placenta. Sa découverte a permis l'émergence du dépistage prénatal non invasif. Un dépistage prénatal

non invasif est un dépistage qui ne nécessite aucune effraction de la peau et donc aucune intervention chirurgicale. Ce type de test implique le séquençage de l'ADN fœtal circulant et pourrait être utilisé afin de détecter le SA.

Les résultats de cette équipe suggèrent qu'il est possible de détecter les altérations du chromosome 15 responsables du SA avec un test prénatal non invasif, même avec un petit échantillon à séquencer. Cependant, cela dépend fortement des paramètres spécifiques du test utilisé. De plus le test a une excellente précision lorsque la longueur de la variation sur le chromosome est suffisamment importante, c'est-à-dire supérieure à 3 millions de paires de bases. Ce type de test prénatal non invasif pourrait être un outil de diagnostic potentiel.

Recherche clinique sur l'épilepsie :

L'épilepsie dans le syndrome d'Angelman : Une revue. S. Debopam (Septembre 2020), *Brain and Development*.

[https://www.brainanddevelopment.com/article/S0387-7604\(20\)30240-0/fulltext](https://www.brainanddevelopment.com/article/S0387-7604(20)30240-0/fulltext)

Des crises d'épilepsie sont présentes chez 80 à 90% des patients atteints du SA. La protéine UBE3A, absente chez les patients atteints du SA, possède un rôle important dans le maintien d'un niveau adéquat du neurotransmetteur acide gamma-aminobutyrique (GABA).

Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur. Il se fixe sur les récepteurs GABA, présents au niveau des neurones et qui sont des canaux calciques. Cette fixation va conduire à l'hyperpolarisation des neurones qui a un effet inhibiteur sur l'activité des neurones. L'hyperpolarisation rend plus difficile (car demande une plus grande dépolarisation pour atteindre le seuil d'excitation) l'activation des neurones par d'autres neurotransmetteurs activateurs tels que l'acétylcholine. Lorsque l'équilibre excitation/ inhibition des neurones est perturbé, par exemple lorsque le niveau du neurotransmetteur GABA est incorrect, des crises d'épilepsie peuvent survenir.

Les personnes atteintes du SA associé à des délétions du chromosome 15 possèdent le phénotype épileptique le plus fort.

Afin de traiter les symptômes, des médicaments antiépileptiques ciblant la signalisation GABAergique, comme le valproate, le phénobarbital et le clonazépam ont beaucoup été utilisés par les cliniciens. Cependant à cause des effets secondaires associés, d'autres médicaments comme levetiracetam, le clobazam, le topiramate, la lamotrigine, l'éthosuximide, la stimulation du nerf vague (VNS) et les régimes alimentaires restreints en glucides sont utilisés de façon préférentielle. En effet, une réduction de la consommation de glucides au profit des lipides semble réduire le phénotype épileptique. La piste de l'utilisation de corticoïdes (prednisone) est aussi explorée.

Les auteurs de la revue indiquent que les perspectives concernant de futures stratégies thérapeutiques reposent sur les approches curatives visant à restaurer l'expression d'UBE3A, telles que décrites dans la partie « Recherche préclinique » de cette veille scientifique.

ESSAIS CLINIQUES

Une fois les phases de recherche préclinique et clinique terminées et des molécules définies afin d'être testées, des essais cliniques peuvent être conduits. Les essais cliniques permettent

de tester l'efficacité et la sûreté d'un traitement chez l'Homme, en définissant son schéma d'administration optimal (doses et fréquence notamment).

Dans le cas le plus général, les essais cliniques sont divisés en 4 catégories, associés à des objectifs différents :

- Phase I : elle est menée sur un nombre restreint de volontaires sains et a pour principal objectif de déterminer la tolérance au traitement et le profil de toxicité du traitement. Cette phase permet de définir la dose et le schéma d'administration du traitement pour la suite de l'essai.

- Phase II : elle est menée sur un nombre restreint de personnes malades et a pour principal objectif de vérifier les résultats de la phase I et d'évaluer l'efficacité thérapeutique du traitement selon le schéma d'administration défini précédemment. Elle étudie son efficacité mais également sa toxicité (effets secondaires) et donc sa sûreté. La dose optimale pour un essai de phase III est recherchée.

- Phase III : elle est menée sur un grand nombre de personnes malades et vise à placer le traitement dans l'arsenal thérapeutique, en le comparant aux traitements disponibles sur le marché, s'ils existent, ou placebo (contrôle sans agent thérapeutique) et afin de s'assurer qu'il apporte une réelle plus-value, et le rapport bénéfice/risque du nouveau traitement. Si la phase 3 est concluante, il y a possibilité de demander une autorisation de mise sur le marché du médicament (AMM).

- Phase IV : elle correspond à un suivi à long terme visant à répertorier d'éventuels effets secondaires qui n'auraient pas été observés lors des phases précédentes. Il s'agit d'une étape de pharmacovigilance. En effet, de par les fortes différences entre les individus, bien que la phase III soit réalisée sur des effectifs très importants (dont le nombre varie selon la rareté de la pathologie), celui-ci peut avoir une efficacité et une toxicité différente sur certains individus. À tout moment, un médicament peut être retiré du marché.

Ces 4 phases correspondent au cas classique d'un médicament dans le cadre d'une maladie relativement fréquente pour laquelle il existe dans certains cas déjà un traitement de référence. Néanmoins dans le cas des maladies rares et/ou graves pour lesquelles il n'existe aucun traitement, ou dans le cas des essais de thérapie génique, certaines phases des essais cliniques sont menées un peu différemment. Notamment certains essais cliniques dits de phase I/II lors desquels la toxicité mais aussi l'efficacité sont évaluées en même temps sont dans certains cas menés directement chez des patients (et non sur des volontaires sains). C'est souvent le cas dans la recherche de traitement ciblant le SA.

De manière générale, pour démontrer l'efficacité du traitement, on va créer 2 groupes de patients qui doivent être comparables (en termes d'âge, de sexe, de pathologies, etc...). Afin d'avoir des groupes identiques on utilise la randomisation, tirage au sort qui permet que le groupe traité et le groupe placebo soient comparables.

Lors des essais cliniques, on parle parfois d'essais en « double aveugle ». Pour montrer qu'un traitement est efficace, il faut comparer un groupe de patients prenant le traitement à un groupe de patients contrôles, aux caractéristiques équivalentes mais ne prenant pas le traitement. Pour minimiser l'impact psychologique lié au fait de ne pas prendre de traitement et évaluer au contraire l'impact lié au fait de penser qu'on est peut-être traité, ce groupe contrôle reçoit un placebo sans le savoir. C'est le premier niveau de l'expression en « aveugle ». Comme l'équipe médicale administrant le traitement pourrait elle aussi se comporter de façon un peu différente avec les patients recevant le traitement et ceux du groupe contrôle, bien souvent elle ne sait pas à quel groupe appartiennent les patients. C'est le « double

aveugle », ni les patients ni l'équipe administrant le traitement ne sait qui reçoit quoi. Ces informations sont révélées uniquement au moment d'interpréter l'essai.

La randomisation et l'approche en double aveugle permettent d'éviter ce qu'on appelle les « biais », des éléments ou des actions susceptibles de fausser la mesure d'efficacité du traitement donc le résultat de l'essai clinique.

Il est à noter qu'en fin d'essai clinique, lorsqu'un traitement fonctionne, il est en général administré aux personnes qui avaient reçu jusque-là un placebo.

Enfin les essais cliniques peuvent aussi concerner des changements de régime alimentaire, comme l'effet d'un régime cétogène dans le cadre du SA.

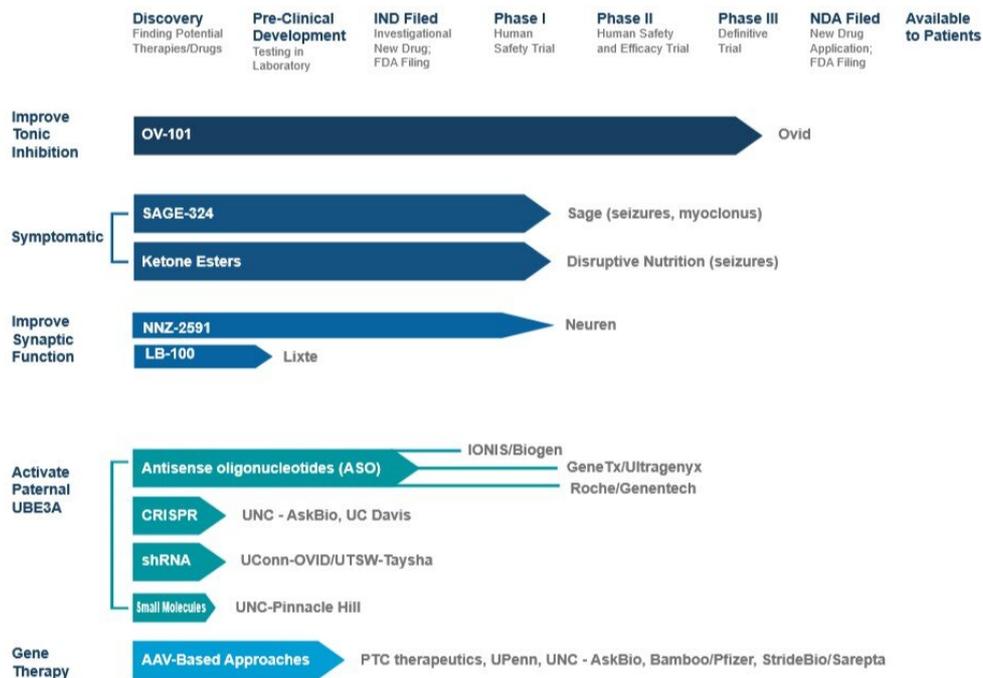
Le site ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>) répertorie les essais cliniques (passés ou en cours). Pour plus d'information sur les essais cliniques concernant le syndrome d'Angelman, vous pouvez consulter le site en indiquant « Angelman Syndrome » dans la fenêtre de recherche « condition or disease » puis cliquer sur « Search ». Le statut indique si l'essai clinique est terminé (« completed »), en cours (« active, not recruiting ») et/ ou en train de recruter (« recruiting »). Début juin 2021, 29 essais étaient répertoriés dans cette base de données.

Dans le cadre du SA, les essais cliniques s'inscrivent en général sur l'un de ces objectifs :

- i) restaurer l'expression du gène *UBE3A*
- ii) cibler des voies situées en aval d'*UBE3A* pour tenter de compenser l'impact de l'absence de cette protéine
- iii) soulager certains symptômes

Une représentation des principaux essais en cours dans le cadre du SA est présenté ci-dessous (Figure 8).

ANGELMAN SYNDROME THERAPEUTIC PIPELINE



* D'autres thérapies peuvent être en cours de développement.

Figure 8 : Pipeline thérapeutique dans le cadre du syndrome d'Angelman

D'après <https://fr.angelmanclinicaltrials.com/drug-development>

Enfin, pour un panorama des essais cliniques annoncés, nous vous invitons aussi à consulter la page Web du site de l'AFSA (Association Française du Syndrome d'Angelman) :

<https://www.angelman-afsa.org/le-syndrome/la-recherche/la-recherche-avance->

La mise au point d'échelles de mesure adaptées au SA (effet plancher pour un certain nombre de tests existants) est indispensable et fait elle-même l'objet d'études scientifiques actuellement.

Ci-dessous, nous détaillons quelques éléments d'information relatifs à certains de ces essais.

Échec de l'essai de phase 3 NEPTUNE de OV101.

<https://www.globenewswire.com/news-release/2020/12/01/2137913/0/en/Ovid-Therapeutics-Announces-Phase-3-NEPTUNE-Clinical-Trial-of-OV101-for-the-Treatment-of-Angelman-Syndrome-Did-Not-Meet-Primary-Endpoint.html>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04106557>

Comme dit dans la veille scientifique de l'année dernière, l'entreprise américaine Ovid Therapeutics a entamé un essai clinique de phase III appelé NEPTUNE (après un succès de l'essai de phase II STARS) pour une molécule agoniste des récepteurs GABA A : le gaboxadol ou OV101. Cet essai était mené en double aveugle sur 104 enfants SA (entre 2 et 12 ans). Un groupe s'est vu attribuer le traitement OV101 une fois par jour au coucher pendant 12 semaines tandis qu'un autre groupe recevait un placebo.

L'entreprise attendait une amélioration du score global sur l'échelle *Clinical Global Impression-Improvement-Angelman syndrome* (CGI-I-AS). Dans un communiqué fait en décembre 2020, Ovid Therapeutics annonçait un échec. En effet, le groupe traité par OV101 présentait une amélioration de 0,7 points par rapport à la référence sur l'échelle CGI-I-AS (*Clinical Global Impression-Improvement-Angelman syndrome*) tandis que le groupe placebo contrôle présentait une amélioration de 0,8 points. La différence entre les groupes n'est pas significative d'un point de vue statistique. Ainsi, ce traitement n'a pas permis une amélioration des symptômes cliniques globaux en début de phase III.

Dans ce même communiqué, l'entreprise annonce que l'essai clinique est alors abandonné au profit d'autres essais mais que les résultats de NEPTUNE, étant la première étude focalisée sur le SA chez les enfants et adolescents, seraient analysés et discutés pour comprendre pleinement l'issue inattendue de la phase III.

Lancement d'un essai clinique de phase I/II sur GTX-102, un oligonucléotide antisens afin de réactiver l'allèle paternel d'UBE3A.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04259281?term=GTX-102&draw=2&rank=1>

<https://www.genetxbio.com>

GTX-102 est un oligonucléotide antisens, une molécule d'ADN qui est créée synthétiquement en laboratoire, qui vise cibler le long ARN non-codant *UBE3A-ATS*. En effet, celui-ci est responsable de l'inhibition de l'expression de l'allèle paternel d'*UBE3A*. Ainsi, l'objectif de ce traitement est de lever l'inhibition sur l'expression de la version paternelle du gène *UBE3A* afin d'améliorer les symptômes du SA. Lors des études précliniques, ce traitement a permis la réactivation de l'allèle paternel chez des souris SA, induisant une amélioration de certains symptômes neurologiques. Ci-dessous, la figure 9 rapporte l'explication du traitement telle que représentée par Ype Elgersma et Monica Sonzogni dans une revue récente.

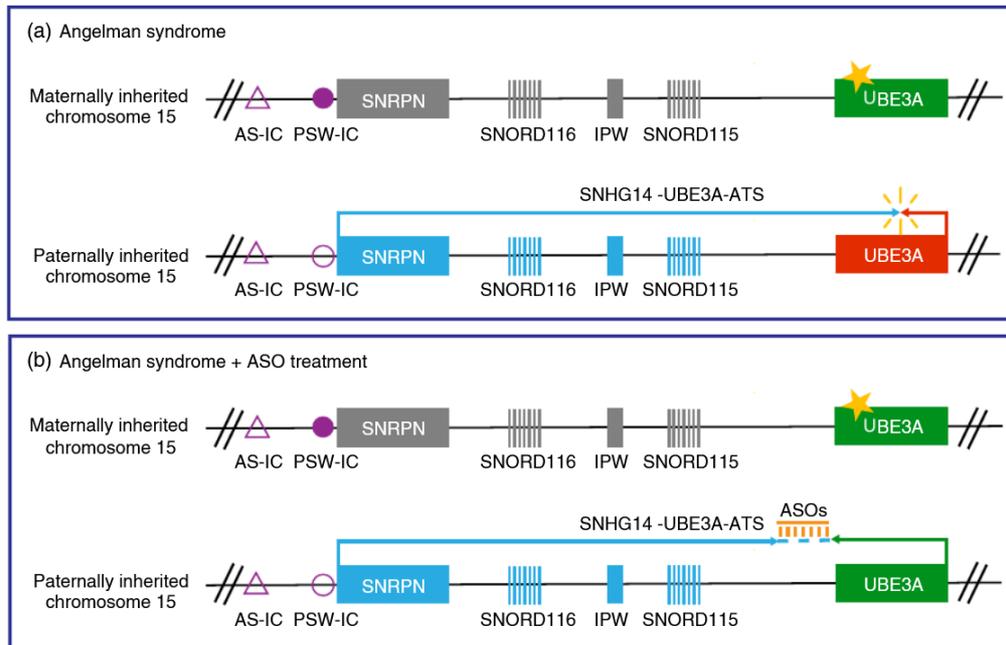


Figure 9 : Mécanisme de l'empreinte neuronale d'*UBE3A* et de la levée de l'extinction de l'expression du gène paternel de l'*UBE3A* par l'intermédiaire d'oligonucléotides antisens (ASO).

D'après Elgersma et Sonzogni, *Developmental Medicine et Child Neurology*, 2021

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dmcn.14831>

- (a) **Vue d'ensemble du locus *UBE3A* dans les neurones d'un individu atteint du SA avec un défaut génétique (indiqué par une étoile) du gène *UBE3A*.** Notez que la plupart des patients atteints du SA sont porteurs d'une délétion de la région décrite, héritée de la mère, qui s'étend bien au-delà du locus du centre d'établissement de l'empreinte du SA (AS-IC) et du gène *UBE3A*.
- (b) **Aperçu de l'expression paternelle d'*UBE3A* dans le SA lors du traitement par ASO (orange).**

Les gènes maternels soumis à empreinte sont représentés en gris. Le centre de mise en place de l'empreinte AS-IC est indiqué par un triangle violet vide. L'absence d'un centre d'empreinte méthylé du syndrome de Prader-Willi (PSW-IC ; indiqué par un cercle violet vide) permet la transcription du long gène non codant *SNHG14*, également connu sous le nom d'*UBE3A-ATS*, que l'on retrouve dans le syndrome de Prader-Willi, qui est responsable de la suppression de la transcription paternelle d'*UBE3A* (rectangle rouge). L'administration d'ASO entraîne le clivage du transcrit *UBE3A-ATS*, ce qui entraîne la suppression de la transcription du gène paternel *UBE3A* (représenté par un rectangle vert), permettant la restauration de la synthèse de la protéine *UBE3A*.

Résultats préliminaires :

Les résultats préliminaires des cinq premiers patients traités indiquent des améliorations substantielles chez tous les patients dans au moins deux domaines du syndrome (dont la communication, le comportement, le sommeil, la motricité globale et la motricité fine) évalués au jour 128 selon l'échelle CGI-I-AS (*Clinical Global Impression-Improvement-Angelman syndrome*). Aux doses les plus élevées, les cinq patients ont présenté un événement indésirable grave correspondant à une faiblesse des membres inférieurs, que l'on pense être lié à une inflammation locale due au GTX-102.

Après arrêt du traitement, ces effets indésirables ont généralement régressé en quelques semaines, tandis que les améliorations du domaine du syndrome ont été maintenues pendant trois mois.

Suite à ces événements, le recrutement de nouveaux patients a été stoppé en attendant de redéfinir les modalités d'administration et de dosage afin de réduire les effets non désirables du médicament.

Pour une note plus détaillée sur ce sujet important, voir :

<https://www.angelman-afsa.org/le-syndrome/la-recherche/genetx-et-ultragenyx-publient-les-resultats-preliminaires-de-l-essai-clinique-de-phase-12>

Nouvel essai clinique lancé au Canada :

Le 19 mai 2021, la société GeneTx Biotherapeutics a reçu l'autorisation pour débiter l'essai clinique au Canada sur des patients âgés de 4 à 17 ans, atteints du SA. Le premier patient recevra le traitement au début du deuxième semestre 2021, pour cette étude clinique de phase I/II. Les premiers résultats de cette phase sont attendus avant la fin de 2021.

Cette étude concerne des patients dont le SA est causé par une délétion complète de l'allèle maternel d'*UBE3A*. Elle évaluera la sécurité et tolérance vis-à-vis d'une version modifiée du traitement (prenant en compte les résultats préliminaires cités ci-dessus) ainsi que la concentration du traitement GTX-102 dans le plasma ainsi que le fluide cérébro-spinal (LCR). Un total d'environ 12 patients, répartis dans différentes catégories d'âge, recevront des doses différentes (technique d'escalade de dose), afin de déterminer la dose avec l'efficacité et la tolérance optimale du traitement.

Comme dit précédemment, les oligonucléotides antisens ciblent le transcrit et nécessitent donc un traitement en plusieurs doses au cours de la vie de l'individu. Il ne s'agit pas d'une modification à long terme au niveau de l'ADN. Ce traitement vise à être administré tous les 3 mois, dans un premier temps, ce qui reste à définir au cours de cette étude.

Sur le site de Genetx, il est indiqué qu'une agence réglementaire nationale en Europe a également donné son accord de principe pour l'extension de l'essai en Europe en utilisant le même plan d'étude modifié proposé, la même stratégie de dosage et d'administration, en attendant l'examen et l'approbation de la demande. La demande de lancement de l'étude clinique dans cette région a été récemment soumise.

Recrutement pour un essai clinique de phase I sur RO7248824, une autre molécule permettant une thérapie antisense afin de réactiver l'allèle paternel d'*UBE3A*.

<https://forpatients.roche.com/en/trials/neurodevelopmental-disorder/angelman-syndrome/a-study-to-investigate-the-safety--tolerability--pharma-19556.html>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04428281?cond=RO7248824&draw=2&rank=1>

Cet essai concerne une molécule appelée RO7248824 qui agit de façon similaire à GTX-102. C'est également un oligonucléotide permettant une thérapie antisense afin de réactiver l'allèle paternel d'*UBE3A* (Figure 9). Cet essai est en cours de recrutement. Il est réalisé par Hoffman-La-Roche. Actuellement 66 personnes SA ont été recrutées aux USA, en Italie, aux Pays-Bas ainsi qu'en Espagne. Elles sont âgées d'un à douze ans. Le traitement en phase I consistera à administrer par injection RO7248824, pendant 8 semaines avec minimum 4 semaines entre 2 injections. Les résultats de l'étude sont attendus pour décembre 2022.

Point d'information sur une question posée lors du webinaire organisé par l'AFSA en février 2021 : Les pistes de type ERT (*Enzyme Replacement Therapy*) peuvent-elles faire sens pour le traitement du SA ?

Les ERT sont des thérapies enzymatiques substitutives. Elles reposent sur l'injection dans le patient de l'enzyme dont l'absence cause une maladie. Les ERT sont utilisés depuis plus de 10 ans dans le traitement de divers syndromes de déficience enzymatique. Elles sont potentiellement prometteuses car elles n'ont pas un caractère définitif (arrêt du traitement possible à tout moment), présentent un bon profil de sécurité et peuvent éventuellement, dans le cas d'injections intraveineuses, être administrées à la maison.

Dans le cas du SA, il s'agirait d'injecter directement, par exemple dans le liquide céphalorachidien, des protéines *UBE3A* purifiées. Comme *UBE3A* agit au sein des neurones, il est envisagé de générer des formes modifiées de la protéine portant une étiquette favorisant leur entrée dans les neurones (il faudrait probablement aussi faire en sorte qu'elles puissent atteindre le noyau de la cellule). Par ailleurs, des études récentes montrent aussi que *UBE3A* est naturellement sécrétée et joue donc peut-être un rôle au niveau extracellulaire, ce qui reste à explorer.

Le Dr Segal (*UC Davis professor of Biochemistry and Molecular Medicine*) explore cette piste de recherche et mène des essais précliniques sur ce sujet.

Pour en savoir plus :

<https://cureangelman.org/pilot-feasibility-of-an-enzyme-replacement-therapy-for-as>

<https://www.cureangelman.es/project/ft2019-007-2019-2021>