

12^{ème} rencontre nationale de l'Association Française du Syndrome d'Angelman

Nouvelles et point de vue sur UBE3A/E6AP et leur rôle dans la conjugaison de l'ubiquitine

Martin SCHEFFNER, Ph.d.

Caractérisation des Mutations UBE3A Patients Angelman

Silvia RUSSO, Ph.d.

Le rôle essentiel du gène UBE3A dans le développement du cerveau

Ype ELGERSMA, Ph.d.

Les transporteurs Monoamine comme cible potentielle de la protéine CamKIIalpha : Implication dans le Syndrome d'Angelman

Harald H. SITTE, Ph.d.

Utilisation de cellules souches pluripotentes dans le Syndrome d'Angelman

Orangeux J. CHAMBERLAIN, Ph.d.

Modèles de système de l'étude de la fonction UBE3A/E6AP

Rossella AVAGLIANO TREZZA, Ph.d.

Mécanismes d'empreinte du gène UBE3A

Angela MABB, Ph. D.

Réactivation ciblée du gène UBE3A dans un modèle murin du Syndrome d'Angelman

David SEGAL, Ph. D.

Nouvelles données et point de vue sur le gène UBE3A, la protéine E6AP et son rôle dans la conjugaison de l'ubiquitine

Martin SCHEFFNER, Ph.d.

Bonjour.

Je tiens à remercier les organisateurs de m'avoir invité à Paris, dans cette si belle ville.

J'ai fait le choix de ne pas répéter la présentation que j'ai faite hier devant un public scientifique, certains en fait m'ont dit qu'ils n'avaient pas tout compris.

Je préfère faire le choix de vous présenter un aperçu de mécanisme de la biologie et de sa complexité. Je ne vais pas pouvoir aborder tous les aspects du Syndrome d'Angelman, mais mes collègues ici présents sont beaucoup plus qualifiés pour le faire et je suis certain qu'ils vous fourniront des idées très intéressantes et les résultats récents de leur recherche.

L'apparition des méthodes de séquençage du génome humain dans son ensemble a été l'un des progrès majeurs de ces vingt dernières années. Aujourd'hui, ceci est possible en quelques jours et donne une quantité d'informations, y compris pour quel type de maladies nous présentons des facteurs génétiques de susceptibilité comme par exemple certains cancers. Ces méthodes de séquençage génomique ont contribué à porter à notre connaissance le nombre de gènes contenus dans les différentes espèces. Le nombre de gènes présents dans le génome d'organismes différents est très surprenant. La levure de Boulanger n'a qu'une seule cellule et qui contient à elle seule environ 6 000 gènes. Quant à nous, Humains, notre organisme a environ 10¹³-10¹⁴ cellules et notre génome ne contient que 20 000 gènes, en d'autres termes, pas plus qu'un petit ver, le nématode, ou qu'un poulet. Comment se fait-il, alors, que nous sommes si différents, d'un ver ou d'une souris qui a, elle, près de 90 % de gènes semblables aux nôtres ?

Le dogme central de la Biologie Moléculaire est: chaque gène est transcrit en ARN (étape de transcription) puis traduit en une protéine (étape de traduction). Compte tenu du fait qu'un être humain a environ 20 000 gènes, selon ce dogme, on s'attend à la production d'environ 20 000 protéines différentes ?

En fait, il n'en est rien, la situation est beaucoup plus complexe, et nous sommes capables de produire un nombre beaucoup plus important de protéines. Comment ? C'est ce que je vais vous expliquer. Il y a en fait deux mécanismes qui vont augmenter notre capacité à produire plus de protéines : l'épissage alternatif et modification post-traductionnelle qui entrent dans le cadre des mécanismes de l'Épigénétique. Par exemple, un gène donné peut permettre de produire différents

ARN messenger via un processus appelé l'Épissage et chacun de ces ARNm produira une protéine différente. En outre, les protéines sont soumises à des modifications post-traductionnelles, c'est-à-dire qu'elles peuvent être modifiées par la fixation de différents groupes chimiques, entraînant de nouvelles propriétés ou fonctions de la protéine. Fait remarquable, plus de 200 types différents de telles modifications sont connus. Ainsi, ces mécanismes, modification d'épissage et post-traductionnelle, génèrent une grande diversité des protéines dans nos cellules. Ceci explique qu'une seule cellule humaine avec ses 20 000 gènes va produire un nombre beaucoup plus important de protéines.

Le corps humain est composé de différents tissus avec des fonctions différentes (cardiaque, squelettique, neurologique, cutané, sanguin...), et toutes les cellules de notre organisme contiennent le même ADN donc la même information génétique. Alors, comment se fait-il que, par exemple, les cellules intestinales fonctionnent très différemment de neurones ? L'explication est qu'une cellule donnée n'exprime pas les 20 000 gènes, mais seulement un sous-ensemble. En d'autres termes, il y a des mécanismes qui permettent aux cellules de se différencier en tissus distincts en n'exprimant que les gènes spécifiques de chaque tissu (c'est-à-dire qu'un sous-ensemble unique de gènes s'exprime dans une cellule donnée). Ces dernières années, beaucoup de progrès ont été réalisés dans ce domaine de recherche, et deux processus majeurs ont été identifiés qui régissent l'expression spécifique des gènes dans les différents tissus. L'une d'entre elles est appelée l'Épigénétique et l'autre s'appuie sur l'existence d'ARN particuliers que l'on appelle « les ARN non codants » ; ces deux processus jouent un rôle majeur pour déterminer quels gènes seront exprimés dans une cellule donnée et dans un tissu donné. Par conséquent, l'épigénétique et/ou ARN non codants sont aujourd'hui des domaines de recherche très étudiés.

Le gène UBE3A est un des exemples d'expression tissu-spécifique. Nous avons deux copies (allèle) de ce gène, un sur le chromosome 15 d'origine maternelle et l'autre sur le chromosome 15 d'origine paternelle. Ces copies du gène UBE3A sont toutes deux exprimées dans la plupart des tissus, les tissus périphériques en particulier, à l'exception de certaines zones du cerveau. De façon spécifique dans ces zones cérébrales, l'allèle paternel est silencieux (c-à-d. qu'il n'est pas ou très faiblement exprimé), on dit qu'il est soumis à empreinte génomique au niveau cérébral, tandis que l'allèle maternel lui seul est exprimé.

Mon unité de recherche étudie les fonctions biochimiques de la protéine UBE3A, produit du gène UBE3A, depuis environ 20 ans. La question essentielle est quel est le rôle de ce gène et sa protéine dans nos cellules ? On sait que la protéine UBE3A contribue à dégrader certaines protéines contenues dans nos cellules. Les protéines ont une durée de vie limitée et seront à un moment donné dégradées. Cela peut sembler une tâche relativement simple, mais c'est en fait un des processus cellulaires des plus complexes. Il faut imaginer une cellule comme un endroit très encombré contenant des millions de molécules différentes. Au sein de cette foule de molécules, il va falloir identifier les protéines qui vont être dégradées par E6-AP et comment ? Notre recherche peut être comparée à la recherche de « Charlie » dans un des livres que nos enfants aiment « Où est Charlie ? ». Lorsque la protéine E6-AP reconnaît une protéine-cible qui doit être dégradée, pour se faire, elle va s'associer à

une autre protéine, l'Ubiquitine et forme alors un complexe protéique appelé E6-AP-UBIQUITINE. C'est ce dernier qui va alors induire la dégradation des protéines cibles.

E6-AP n'a pas uniquement une fonction dans la dégradation des protéines mais elle fait également dans la conjugaison de protéines via le système « Ubiquitine-conjugaison ». L'importance de ce mécanisme biologique pour nos cellules est illustrée par le fait que le génome humain contient environ 600 gènes codant des protéines, dont la fonction - comme UBE3A - est d'identifier les protéines qui peuvent être modifiées par l'Ubiquitine. Ce système est l'un des plus complexes systèmes enzymatiques de nos cellules. Il est remarquable que le système de l'ubiquitine est hautement conservé dans tous les organismes, des eucaryotes aux procaryotes, et est retrouvé chez la levure, le nématode (petit vers) et l'homme. Il est important de souligner qu'un grand nombre de processus biologiques fondamentaux sont contrôlés en partie par ce système. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'un défaut de ce système est responsable d'une large variété de maladies humaines comme certains cancers, des affections neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou le syndrome d'Angelman.

Ce mécanisme biologique est un excellent modèle d'étude du développement de ces maladies humaines. Quand j'étais un post-doctorant dans les années 1990, nous avons découvert initialement que la protéine E6-AP est une protéine cellulaire qui va être détournée et utilisée par une autre protéine qui est une oncoprotéine associée aux virus du papillome humain (HPV16, HPV18) et va alors induire un cancer du col de l'utérus. Cette interaction entre ces deux protéines est un événement clé pour le développement de ce cancer. Quelques années plus tard, comme vous le savez, il a été démontré que la perte d'expression du gène UBE3A et donc l'absence de production de la protéine E6-AP entraîne l'apparition du syndrome d'Angelman. Plus tard, il a été mentionné que la surexpression du gène UBE3A contribue aux troubles du spectre autistique chez la souris. Le gène UBE3A est donc très intéressant pour les scientifiques de différents domaines. Il représente une porte d'entrée à la recherche de stratégies thérapeutiques dans les différentes pathologies identifiées (cancer du col utérin, syndrome d'Angelman, troubles du spectre autistique).

Le gène UBE3A a été identifié il ya plus de 20 ans, bien avant d'être connu comme la cause du Syndrome d'Angelman. Cependant, il reste encore beaucoup à apprendre sur UBE3A. Par exemple, nous ne savons toujours pas quelles sont les protéines cibles de la protéine E6-AP et lesquelles sont intéressantes en particulier au niveau du développement cérébral qui nous intéresse dans ce syndrome. De plus, il reste à savoir comment est régulée son activité ? Ces dernières années, nous avons travaillé sur ces points et nous avons obtenu des preuves que UBE3A seul est peu actif et que son activité doit probablement être stimulée par d'autres protéines. Puisque les patients Angelman sont censés avoir quelques protéines résiduelles E6-AP, nous développons actuellement un modèle pour détecter ces protéines qui peuvent activer le gène UBE3A par, ce que l'on appelle, des méthodes de criblage à haut débit. Une fois identifiées, ces molécules pourront finalement - peut-être dans 10-15 ans – contribuer à activer le gène UBE3A chez les enfants Angelman.

Caractérisation des mutations du gène UBE3A chez les patients Angelman

Silvia RUSSO, Ph.d.

Un grand merci aux organisateurs de m'avoir invitée. Merci, également, à Martin Scheffner, dont la conférence rend mon intervention plus facile. Enfin, un salut spécial à Jonas, qui est assis au dernier rang. Aujourd'hui, ma présentation traite des mutations du gène UBE3A et, plus précisément, du mécanisme sous-jacent qui conduit à l'apparition du Syndrome d'Angelman.

La perte de fonction du gène UBE3A entraîne l'absence de production de la protéine E6-AP qui est responsable du syndrome d'Angelman. L'anomalie la plus fréquente est la délétion de la région 15q11-q13 qui contient le gène UBE3A, survenant sur le chromosome 15 d'origine maternelle. Elle est responsable de 70 % des cas de Syndrome d'Angelman. D'autres patients ont eux hérité de deux chromosomes 15 d'origine paternelle sans contribution maternelle, c'est ce que l'on appelle une disomie paternelle. La région chromosomique 15q11-q13 présente une particularité fonctionnelle. En effet, cette région chromosomique sur le chromosome 15 d'origine paternelle est inactivée et donc silencieuse, car soumise au mécanisme d'empreinte parentale. Le gène UBE3A est non fonctionnel car soumis à cette empreinte et ne peut pas donc produire la protéine E6-AP ce qui a pour conséquence l'apparition du syndrome d'Angelman. Cela représente 5% des patients.

Le gène UBE3A comporte 16 exons, sa région régulatrice est localisée dans la partie terminale du gène et n'a pas de fonction connue. Elle présente également un haut degré de méthylation de son ADN, qui rend le séquençage difficile et peut induire des erreurs et des difficultés d'interprétation. Ce gène comme tous nos gènes sont traduits en ARN messager. Lorsqu'une lettre (base) de l'ADN qui compose le gène est absente ou deux lettres sont inversées, la protéine qui va en résulter sera défectueuse et conduira à l'apparition du syndrome d'Angelman.

Le Syndrome d'Angelman peut s'exprimer avec un degré de gravité différent et surtout avec une variabilité de l'intensité des signes cliniques selon les patients, et cela est le plus souvent dépendant de la classe moléculaire. Pour un patient avec une disomie monoparentale, les effets sont moins importants; par exemple, les facultés de communication sont mieux préservées. Dans le cas d'une délétion, la perte des gènes environnants du gène UBE3A et contenus dans la région 15q11-q13 rend probablement l'expression clinique plus sévère. Chez ces patients, l'épilepsie est plus présente et le langage quasi absent.

L'étude des mutations les plus fréquentes permet d'essayer de comprendre les fonctions de ce gène. Il est important de souligner l'importance du gène UBE3A, dont l'activité est variable selon les tissus de l'organisme. Le syndrome d'Angelman peut apparaître lorsque la protéine est très faiblement produite. La présence de copies supplémentaires du gène UBE3A tel qu'on le voit dans les

duplications 15q11-q13 provoque d'autres phénotypes neurologiques avec une symptomatologie autistique.

Le gène UBE3A produit la protéine E6-AP qui est une protéine ligase. Cette protéine contient un domaine HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus), domaine fonctionnel important qui se lie à une autre protéine ligase, E2, qui vont activer le système de l'ubiquitine et ainsi permettre la dégradation de protéines cibles. Les neurones communiquent entre eux via les synapses et on sait maintenant que la protéine E6-AP joue un rôle important dans les fonctions synaptiques pendant le développement cérébral et tout au cours de la vie. Jusqu'à présent, nous avons été en mesure d'identifier quelques-unes des protéines cibles de la protéine E6-AP.

Les processus de transcription des gènes en ARN puis la traduction de ces ARN en protéines peuvent être comparés à un grand puzzle. Il est essentiel que tout soit absolument parfait. Il existe plusieurs configurations possibles à ce processus de transcription car en effet le gène UBE3A va permettre de produire trois iso-formes d'ARN (3 protéines différentes). Il doit y avoir probablement des interactions entre les trois protéines issues de ces 3 ARN messagers. Dans une étude publiée en septembre dernier, le Professeur Fang aux Etats Unis, a fait une revue de toutes les mutations du gène UBE3A identifiées dans la cohorte de patients de son équipe. Dans sa série de patients adressés avec un diagnostic clinique de Syndrome d'Angelman, son équipe retrouve seulement 4,41 % de mutations dans le gène UBE3A. Dans notre cohorte italienne, une mutation a été retrouvée dans la moitié des cas. La différence peut, cependant, résulter d'une origine géographique distincte, et cela doit être étudié en profondeur.

De nombreuses mutations sont localisées dans la partie distale de la protéine E6-AP. Cette région est cruciale, car elle contient des acides aminés qui contribuent à la fonction catalytique de la protéine (domaine HECT). Une mutation du gène UBE3A est retrouvée chez 27 % des patients de la cohorte italienne. Comme notre Institut a été le premier à séquencer UBE3A, nous avons pu regrouper tous les patients italiens qui avaient une analyse de la méthylation normale (ce qui exclut chez eux une délétion 15q11-q13), une disomie paternelle et une anomalie de l'empreinte. Dans notre cohorte, nous avons trois mutations récurrentes et 41 mutations uniques. La fréquence de la transmission mère-enfant s'est avérée être de 40 % puisque nous avons identifié la mutation chez 15 mères de 36 patients.

Une mutation peut survenir en mosaïque ce qui fait que même si les mères ne sont pas conductrices, le risque d'avoir d'autres enfants avec UBE3A mutation n'est pas négligeable. Cela démontre l'importance de la consultation génétique pouvant être offerte aux parents.

Le gène UBE3A comme tous les gènes de notre génome mute. Il apparaît donc des variations dans la séquence du gène.

Certaines sont pathogènes et ont pour conséquence une erreur dans le code génétique avec l'apparition du syndrome d'Angelman. C'est le cas, des mutations non-sens, mutations ponctuelles avec perte ou gain d'une lettre qui vont avoir pour conséquence une protéine tronquée ou absente.

C'est aussi le cas des mutations faux-sens c'est-à-dire la substitution d'une lettre par une autre qui peut ainsi modifier un seul acide aminé de la protéine et entraîner la perte de fonction de la protéine E6-AP.

Mais certaines variations que nous mettons en évidence ne sont pas pathogènes : ce sont seulement des variations qui ne provoquent pas la maladie, et elles expliquent la variabilité de l'homme, ce sont les mutations dites silencieuses.

Pour nous, il est parfois difficile de savoir quel est le statut de la variation de séquence que nous avons identifié, la question est : s'agit-il d'une mutation faux-sens ou d'une mutation silencieuse ? Il faut alors étudier le statut de plusieurs membres de la famille par rapport à cette variation, en sont-ils porteurs ? Nous étudions les parents et les soeurs ou frères sains du patient et ceci nous permet souvent de savoir si la variation identifiée chez le patient est bien la cause du syndrome d'Angelman.

Il existe également des mutations qui affectent l'épissage du gène qui sont difficiles à identifier comme les mutations faux-sens et font partie du casse-tête auquel je faisais allusion précédemment.

Les patients en fonction de leur mutation vont avoir des différences d'expression clinique. C'est comme pour les patients présentant une disomie paternelle qui peuvent être en mesure de prononcer différents mots et des phrases courtes. Par conséquent, il est important d'identifier quelles fonctions sont préservées, ce qui rend possible pour eux par exemple une meilleure communication avec leur entourage. Beaucoup de patients avec une mutation du gène UBE3A peuvent acquérir la marche de façon plus précoce, autour de 2 ans. En outre, dans la moitié de notre cohorte, aucun patient n'a présenté une scoliose.

En ce qui concerne les mutations faux-sens, les patients diffèrent aussi l'un de l'autre. Nous sommes pour le moment incapables d'établir des corrélations phénotype- génotype. Une mutation faux-sens peut avoir des répercussions sur les fonctions essentielles de la protéine. D'autres sont moins délétères et sont mieux tolérées par l'organisme. Par exemple, si un acide aminé ou une région spécifique est remplacée, les protéines cibles formeront une connexion. Chez certains patients, un seul acide aminé est absent: Ceci est considéré comme un faux-positif car la protéine est produite, mais il manque une lettre et on sait que tous les acides aminés sont importants mais à des degrés différents. Lorsqu'un d'entre eux est absent, la forme tertiaire de la protéine qui est la forme fonctionnelle est modifiée et ses fonctions vont donc être perturbées. En fonction du domaine fonctionnel touché par cette modification, le patient aura une atteinte plus ou moins sévère. Mais pour le moment, il nous est difficile de le prédire.

Par le biais d'analyse bio-informatique, il est devenu envisageable de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent les effets d'une variation de séquence. Nous allons pouvoir maintenant conclure sur les effets pathogènes ou non d'une mutation faux-sens en incluant les données des études familiales. Avec l'aide des études fonctionnelles, nous serons encore plus à même de confirmer ou d'infirmer l'effet pathogène ou non des variations de séquence.

En conclusion, je tiens à remercier tous ceux qui ont travaillé avec nous, y compris les cliniciens qui sont aux côtés des patients. Les données cliniques sont essentielles pour essayer de comprendre l'expression clinique de ce syndrome.

Le rôle essentiel du gène UBE3A dans le développement cérébral

Ype ELGERSMA, Ph.d.

Bonjour, tout le monde. C'est un plaisir pour moi d'être à Paris. La rencontre scientifique internationale d'hier a été un véritable succès. Aujourd'hui, je voudrais vous parler de nos études récentes sur le gène UBE3A et la protéine E6-AP et leur rôle au cours du développement cérébral. La question que nous nous sommes posée est la suivante: y a-t-il un moment ou une fenêtre critique de sa fonction au cours du développement du cerveau ? Je tiens également à remercier les parents qui ont rendu possible le développement de nos recherches grâce à leur don. Notre laboratoire travaille maintenant sur le syndrome d'Angelman depuis dix ans.

Environ 1 % des nouveau-nés souffrent de déficience intellectuelle. Parmi eux, 25 à 50 % de ces enfants sont porteurs d'une mutation dans un gène qui entraîne un handicap mental. Le gène UBE3A est l'un des 500 gènes impliqués dans la déficience intellectuelle.

Nous avons mis en place un centre d'expertise clinique pour ces enfants au centre médical d'Erasmus à Rotterdam, afin de mieux aider vos enfants. Ce centre s'appelle le centre d'expertise « ENCORE » dédié aux troubles du développement neurologique. Des centaines d'enfants viennent nous consulter, y compris d'origine française. Nous souhaitons offrir les soins cliniques les meilleurs possibles à vos enfants.

Notre laboratoire a engagé des travaux de recherche pour essayer de comprendre le syndrome d'Angelman. Comme l'humain, la souris présente le gène UBE3A sur son chromosome 7 qui est l'homologue de l'homme. Nous avons donc choisi la souris comme modèle pour nos recherches. Ceci nous donne la possibilité d'étudier en particulier le cerveau de la souris. Nous regardons la fonction des protéines au niveau neuronal et, ce faisant, nous espérons mieux comprendre le syndrome d'Angelman dans l'objectif d'identifier de nouveaux traitements pour les patients. Quatre essais cliniques sont maintenant en cours dans notre centre. Notre objectif à terme est en fin de compte de donner une meilleure qualité de vie pour les enfants et les familles affectées.

Notre laboratoire se concentre tout particulièrement sur la compréhension du rôle du gène UBE3A. Nous étudions la façon dont le traitement des symptômes, comme le traitement de l'épilepsie, peut être amélioré. Enfin, nous nous efforçons de trouver une voie de recherche pour activer le gène paternel.

L'homme comporte 46 chromosomes, chaque parent apportant une copie d'un chromosome. Cela signifie que si nous avons bien reçu 23 chromosomes d'origine paternelle et 23 chromosomes d'origine maternelle, le développement après fécondation se fera normalement.

Un des régions du chromosome 15, la région qui nous intéresse, 15q11q13 se différencie par le fait qu'une seule copie est active, c'est la copie maternelle. En effet, la copie paternelle est silencieuse, inactive car soumise au phénomène d'empreinte parentale.

On sait que le syndrome d'Angelman est du à l'absence d'expression du gène UBE3A par les différents mécanismes moléculaires, délétion, disomie paternelle, mutation du gène UBE3A ou anomalie de l'empreinte qui surviennent sur la copie maternelle.

Nos travaux ont pour objectif de permettre la réactivation de la copie paternelle du gène UBE3A.

La copie du gène UBE3A est inactivée grâce à un gène appelé, l'Antisens d'UBE3A (ATS-UBE3A) qui produit un ARN qui va bloquer le gène UBE3A et ce uniquement sur l'allèle paternel.

Comme la plupart des groupes de recherche qui s'intéressent au syndrome d'Angelman, nous cherchons quels sont les moyens que nous pouvons envisager pour activer cette copie paternelle d'UBE3A. Les laboratoires de Ben Philpot et Arthur Beaudet sont parvenus à activer le gène Ube3a paternel sur des modèles animaux et nous avons pu répliquer leurs résultats.

Une des approches est l'utilisation du Topotécan (topoisomérase). Les topoisomérases sont des protéines qui se lient à l'ADN, et qui sont capables de façon générale d'empêcher la synthèse d'ARN. Le Topotécan est un médicament actuellement utilisé pour traiter certains cancers.

Une autre voie de recherche consiste à utiliser un oligonucléotide anti-sens, qui va empêcher la transcription du gène Antisens et, ce faisant, va conduire à l'activation du gène UBE3A d'origine paternelle. Cette approche est prometteuse et il est aujourd'hui envisagé de mettre au point des essais cliniques chez les patients via un laboratoire ayant l'expérience des thérapeutiques utilisant des anti-sens dans les maladies génétiques.

Pour le moment, nous ne savons pas quels types de patients pourraient bénéficier de cette approche d'activation du gène paternel chez l'homme, et à quel âge, chez le fœtus, le nouveau-né, à l'âge de 10 ans et pendant combien de temps ? Pour le moment, nous avons essayé de réactiver ce gène chez la souris à différents âges. Il faut savoir que notre cerveau passe par différentes phases de développement. Par exemple, il est difficile d'apprendre une langue à l'âge adulte. Et le domaine de recherche des neurosciences nous apprend qu'une langue apprise à l'âge adulte n'est pas stockée au même endroit qu'une langue apprise enfant. Autre exemple, pour qu'une personne soit en mesure de percevoir les deux yeux d'un autre visage, il faut qu'il y ait une phase d'apprentissage d'une zone cérébrale et ceci à l'âge de huit ans. Un déficit visuel n'est plus traitable 15 à 20 ans après si les zones cérébrales visuelles n'ont pas été activées. Chez les souris, la fenêtre critique de la vision binoculaire est située à l'âge de cinq semaines. Par conséquent, le développement du cerveau de la souris est beaucoup plus rapide. Une autre fenêtre critique existe également pour l'audition : un enfant atteint de surdité doit disposer d'un appareil auditif très tôt pour récupérer l'audition. De même, un enfant qui n'a pas d'activité sociale ou d'interaction aura de grandes difficultés pour apprendre le lien à l'autre à un âge plus tardif.

Si le cerveau d'une souris, atteinte du syndrome d'Angelman est traité, il exprime le gène UBE3A. On observe alors la régression des signes du syndrome d'Angelman. Grâce à une série d'expériences,

nous avons essayé de regarder si la souris traitée retrouvait sa capacité de marche et sur quelle durée, et si elle a un comportement normal et de bonnes capacités d'apprentissage.

Nous avons d'abord commencé par activer le gène chez l'embryon. A la naissance, on observe que la souris n'exprime pas le syndrome d'Angelman et n'a pas de mal à se déplacer, contrairement aux souris non traitées. Avec un autre test, on voit que les souris essaient d'enterrer des marbres dans le sable. Lorsque le gène est réactivé dès le début, l'anxiété de la souris Angelman disparaît. Dans un autre test dit de plein champ, les souris Angelman sont placées dans des champs et, ainsi, on observe leur comportement très anxieux et instable alors que ces signes disparaissent chez les souris traitées. En ce qui concerne, un autre test, le test de sociabilité, les souris étaient censées construire leur nid avec des accessoires que nous leur avons fournis. Contrairement aux souris traitées, les souris Angelman ne construisent pas leur nid, ou le font très lentement. Une fois que le gène est exprimé, les souris Angelman récupèrent un comportement parfaitement normal et construisent leur nid. En d'autres termes, lorsque le gène est exprimé dès le début du développement embryonnaire, le retour à un comportement social normal est possible. Les effets positifs sont également manifestes pour l'épilepsie qui disparaît chez les souris traitées à ce stade.

En d'autres termes, le début de l'activation du gène au cours du développement de l'embryon peut être utilisé pour traiter et soigner les symptômes chez la souris. Que se passe-t-il si nous activons le gène à une date ultérieure ? Une série d'expériences a été réalisée pour s'assurer que l'action thérapeutique est également efficace sur les jeunes souris et souris adultes.

Les souris juvéniles, âgées de trois semaines, n'ont plus besoin de soins maternels, elles sont autonomes et se nourrissent seules. A 6 semaines, les souris sont considérées comme adolescentes et sont capables de se reproduire. Les souris adultes sont âgées de 14 semaines. Nous avons étudié le comportement de ces trois groupes de souris après activation du gène et après un certain délai d'observation en les comparant à trois groupes de souris non traitées pour observer les effets du traitement. Nous avons alors observé que la motricité des souris juvéniles peut être entièrement restaurée. Les résultats ne sont pas aussi probants chez les souris adolescentes, mais se traduisent quand même par une amélioration significative. Néanmoins, les effets chez les souris traitées à l'âge adulte sont relativement limités. Nous n'avons en effet pas noté de différence entre des souris traitées et les souris Angelman. Cela montre qu'il est crucial d'administrer le traitement dès que possible. Plus tardif est le traitement, moins la chance de récupération est possible

Les signes de l'anxiété sont les plus difficiles à traiter. La réactivation du gène chez les souris juvéniles n'a pas fait disparaître l'anxiété pendant les différents tests cognitifs qu'elles ont subis, test d'enfouissement de marbre et test de comportement en plein champ. De même, le test de construction d'un nid ne donnait pas de résultats concluants. Les souris traitées de trois semaines montrent aussi une mauvaise réponse à ces tests. De plus, nous n'avons pas pu prendre en compte l'épilepsie. Néanmoins, les médicaments anti-épileptiques sont efficaces sur ces souris. Par conséquent, il est essentiel que les traitements symptomatiques se développent, en même temps que les études en cours sur la réactivation du gène UBE3A.

Nous ne pouvons pas injecter notre traitement chez les souris nouveau-né. C'est la raison pour laquelle nous avons injecté le médicament chez les souris mères. Nous avons alors observé que 30 % des cellules ont l'expression du gène réactivé. Ce niveau d'expression suffit à restaurer les aptitudes motrices et également à diminuer l'anxiété.

La plasticité neuronale est essentielle à l'apprentissage. Lorsque nous apprenons, nous améliorons notre plasticité neuronale, et nos neurones sont constamment en lien. Les connexions peuvent être mesurées à l'aide de méthodes d'électrophysiologie. La réactivation du gène chez les jeunes souris permet au cerveau de récupérer sa plasticité. De même, la plasticité peut être entièrement récupérée chez les souris adultes lorsque le gène est activé. Il s'agit d'une découverte importante.

En résumé, la réactivation du gène UBE3A semble avoir un effet limité sur le comportement comme l'anxiété, mais peut restituer une partie du déficit moteur, en particulier chez les jeunes enfants et les adolescents. Enfin, la réactivation du gène permet de récupérer la plasticité neuronale, même chez des souris adultes. Cette réactivation du gène semble donc très prometteuse, mais d'autres possibilités sont à explorer, car la réactivation de l'expression du gène UBE3A seule ne sera probablement pas en mesure de traiter toutes les signes cliniques.

Je vous remercie.

Transporteurs de monoamine comme cible potentielle de CamKIIalpha : Implications pour le Syndrome d'Angelman

Harald H. SITTE, Ph.d.

[L'enregistrement commence au milieu de la présentation].

Nous passons par différentes étapes de sommeil, du sommeil profond au sommeil paradoxal, au cours duquel les yeux sont en mouvement sous les paupières. Le sommeil paradoxal est intéressant car il constitue la phase du rêve. Le sommeil est un cycle qui passe par différentes étapes et, une fois que nous avons assez dormi, nous nous réveillons. La régulation du sommeil dépend d'un certain nombre de facteurs et de l'activité de différents neurotransmetteurs. Certains neurotransmetteurs amènent vers l'état d'éveil quand d'autres nous en éloignent. La sérotonine constitue l'un de ces neurotransmetteurs. Son étude par rapport au syndrome d'Angelman est importante compte tenu des troubles du sommeil présents chez ces enfants.

Pharmacologue d'origine, je m'intéresse à la façon dont les médicaments agissent. J'ai notamment étudié la cocaïne et les drogues illicites. Nous avons découvert au cours d'une étude sur les transporteurs que l'action des amphétamines était importante sur la synapse intracellulaire neuronale via une protéine kinase intracellulaire, la protéine CamKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha). Les amphétamines agissent par induction en inversant le transport au niveau des transporteurs des monoamines et en augmentant donc par conséquent la concentration des monoamines au niveau synaptique. Nous pouvons mesurer l'intérêt d'études fonctionnelles et, de plus, étudier de près la fonction du transporteur des monoamines.

J'ai rencontré Ype Elgersma, qui étudie la protéine CaM kinase II dans le cadre de son post-doctorat, en Californie. Il a constaté que nos observations étaient les mêmes que ce qu'il avait constaté chez des souris atteintes du syndrome d'Angelman. Nous nous sommes donc lancés dans une recherche conjointe et nous avons plus spécifiquement étudié le comportement des souris knock-out CaM kinase II et des souris Angelman après administration d'amphétamine et de cocaïne. Les résultats sont exactement les mêmes : les effets sont délétères de façon significative chez les souris Angelman. Les transporteurs de la sérotonine peuvent donc être une cible pour un médicament ou une molécule pour améliorer le comportement et le sommeil chez les patients Angelman. Ainsi, si nous parvenons à atteindre une cible grâce à un médicament, nous pourrions agir sur le syndrome d'Angelman.

Ce projet constitue un véritable défi. Cependant, d'autres études, dont celle de Farouk publiée il y a deux ans, ont des résultats exactement inverses aux nôtres. Cette différence entre les travaux des nos laboratoires appelle à davantage de recherches sur la question. Un article de Malanga et Philpot

étudie les niveaux de dopamine et eux n'ont pas trouvé de modification. Nos études seront donc à renouveler afin d'essayer de progresser dans la compréhension des mécanismes sous-jacents. Nous allons mesurer les taux extracellulaire de la sérotonine et nous envisageons d'utiliser ce médicament. Nous espérons parvenir à trouver des solutions thérapeutiques qui pourraient améliorer le sommeil.

Je vous remercie de votre attention.

Utilisation de cellules souches pluripotentes comme modèle dans le Syndrome d'Angelman

Stormy CHAMBERLAIN , Ph.d.

Notre laboratoire utilise des cellules souches humaines pour étudier le syndrome d'Angelman. Le corps contient différents types de cellules, des cellules épidermiques aux neurones. Les cellules souches ont un intérêt majeur car elles ont la capacité de se transformer en n'importe quel type de cellule de notre corps. Les cellules souches pluripotentes sont induites, ce qui signifie qu'elles peuvent être créées en laboratoire. Vous avez probablement entendu parler de cellules souches embryonnaires, qui peuvent être créées en laboratoire par le biais de fécondation in vitro. L'embryon est disposé dans un milieu de culture jusqu'à ce que les cellules souches se développent, c'est-à-dire au tout début du développement embryonnaire. L'utilisation de cellules souches soulève des questions, en particulier en raison de la faible disponibilité d'embryons atteints du Syndrome d'Angelman.

Nous utilisons des échantillons de sang et de peau de patients Angelman afin de procéder à la fabrication de cellules souches. Nous disposons maintenant de cellules souches provenant de patients ayant tous types de mutations, ce qui nous a permis de développer des lignées de cellules souches. Les cellules souches produites en laboratoire ont été soumises à un test de méthylation pour s'assurer qu'elles étaient toutes porteuses d'une anomalie moléculaire décrite dans le syndrome d'Angelman.

Ces cellules souches, toutes validées, ont ensuite été reprogrammées en neurones semblables aux neurones humains. Les neurones constituent en effet le tissu cible dans le syndrome d'Angelman. Toutefois, ces cellules n'ont pas été fabriquées dans le but de constituer des cellules de substitution, ce qui pourrait aggraver les problèmes de vos enfants. L'objectif est plutôt de comprendre cette maladie, de savoir comment elle agit et de tester des thérapies potentielles. Notre laboratoire peut ainsi tester l'efficacité des différentes thérapies évoquées par mes collègues sur le neurone humain.

Afin d'être certains que nos cellules étaient atteintes du syndrome d'Angelman, nous avons mené un test supplémentaire. Nous nous sommes demandé si le gène UBE3A était inactivé. Dans les neurones des patients atteints du syndrome d'Angelman, le gène UBE3A n'est pas fonctionnel et ne produit pas d'ARN donc pas de protéine non plus. La seule copie du chromosome 15 présente, la copie paternelle, n'est pas fonctionnelle car inactivée. Nous souhaitons donc vérifier si ce même schéma est présent dans les neurones dérivés des cellules souches.

Nous nous sommes penchés sur les différentes formes de transcription du gène en regardant lesquelles sont spécifiques du cerveau. Nous avons observé que le processus d'empreinte permettant

à UBE3A d'être inactivé fonctionne également dans les cellules souches. La protéine est ensuite absente des neurones, ce qui est le cas chez vos enfants.

Ainsi, les cellules cutanées et les cellules du sang peuvent être utilisées comme support pour obtenir des cellules souches IPS. L'analyse de la méthylation permet ensuite de s'assurer que ces cellules sont bien similaires aux cellules des patients Angelman. On a observé que ces cellules IPS ne fabriquent l'Anti-Sens d'UBE3A que lorsqu'elles se différencient en neurones.

Mon laboratoire s'interroge sur le rôle et la fonction de l'Anti-Sens d'UBE3A qui n'agit pas de la même manière selon le type de cellule. Il est différent dans une cellule souche ou un neurone. En effet, le panneau stop qui bloque l'Anti-Sens d'UBE3A, comme sur l'allèle maternel, pourrait constituer une cible thérapeutique dans le traitement du syndrome d'Angelman. Il est à mentionner que les souris ne disposent pas d'un panneau stop, la régulation est différente, le mécanisme d'empreinte est sensiblement différent entre la souris et l'homme. Il est donc important d'effectuer des recherches sur l'humain.

Nous pensons que la protéine CTCF pourrait constituer le panneau d'arrêt en question. Nous avons donc recherché sa présence dans la région du panneau d'arrêt. Cette protéine ne présente de liaison qu'au niveau de l'allèle paternel. Elle est absente des neurones, ce qui est logique dans la mesure où son absence permet à l'anti-sens d'apparaître.

La morphologie des neurones des patients atteints du syndrome d'Angelman peut être également étudiée avec notre approche. Une synapse constitue l'interface entre deux neurones. Les neurones des souris atteintes du syndrome d'Angelman présentent moins d'épines dendritiques que ceux des souris normales. Un de mes collègues du Connecticut mène actuellement de telles études.

Nous nous demandons également si les neurones peuvent envoyer des signaux. De telles études ne peuvent être réalisées sur des tissus post-mortem et doivent être effectuées sur des neurones vivants. Elles permettent de comprendre ce qui ne fonctionne pas et d'envisager des voies de traitements.

Il est également possible de réaliser un test pour vérifier l'efficacité du médicament dans les neurones. Un inhibiteur de la topoisomérase (Topotécan) permet d'inactiver l'Anti-Sens d'UBE3A afin d'activer l'expression du gène UBE3A. Pour faire réapparaître l'expression de ce gène, les neurones humains nécessitent un traitement plus long que ceux de la souris, et à dose plus élevée. Lorsque la concentration du gène UBE3A augmente chez la souris en 3 jours, il faut 6 jours chez l'humain. Nous devons donc trouver des molécules thérapeutiques plus adaptées. On peut imaginer que des médicaments déjà disponibles pour d'autres indications peuvent peut-être avoir un effet sur l'UBE3A.

Il est possible d'utiliser notre modèle d'étude chez l'homme et chez la souris en créant des cellules souches IPS dans les deux espèces et ensuite comparer leur fonctionnement et identifier leurs différences. Ben Philpot a montré que le Topotécan fonctionnait sur de grands gènes. Nous utilisons également les neurones pour identifier des bio-marqueurs qui devraient nous permettre de déterminer si le traitement fonctionne. Il est en effet important de savoir si le médicament est actif dans le cerveau sans devoir mesurer ses résultats. Vous devez par exemple pouvoir savoir si le médicament agit sans avoir à vérifier si votre enfant progresse dans tous les domaines. En outre, l'absence de résultats

probants chez l'adulte risquerait de compromettre les essais sur l'enfant. Ceci explique l'importance du biomarqueur.

Nous développons également de nouveaux modèles de recherche. Nous avons fait une culture de cellules neuronales dans une boîte de Pétri qui nous permet d'étudier les neurones de manière plus efficace.

Les cellules souches sont utilisées pour étudier le syndrome d'Angelman dans des neurones humains vivants. Si la souris constitue un bon outil, des différences notables existent entre l'humain et cette dernière. Nous devons savoir à quoi ressemblent les neurones humains atteints d'Angelman et comment ils se comportent. Ces neurones peuvent ensuite être utilisés pour tester les médicaments et en créer de nouveaux.

Mon laboratoire travaille avec d'autres laboratoires, des étudiants, des post-doctorants, le NIH, l'Etat du Connecticut, la Fondation Raymond and Beverly Sackler et la Fondation Angelman, qui m'a permis d'être aujourd'hui présente.

Modèles d'étude de la fonction du gene UBE3A et de sa protéine E6-AP

Rossella AVAGLIANO TREZZA, Ph.D.

Je souhaite tout d'abord remercier l'AFSA de me donner l'occasion de participer à cet excellent séminaire. Je vais aborder les modèles que notre laboratoire utilise afin d'étudier le syndrome d'Angelman et la fonction de la protéine produite par le gène UBE3A, également appelée E6-AP. Notre laboratoire est situé à Amsterdam, mais, comme vous l'aurez deviné, je suis italienne. Je travaille au centre médical universitaire d'Amsterdam. Les organisateurs m'ont informée que je m'adresserai aujourd'hui à des parents. J'ai donc choisi de me mettre à votre place et de réfléchir à la meilleure manière de faire cette présentation, mais je me suis rapidement rendue compte que cette tâche était plus ardue qu'il n'y paraissait.

Le très connu Pac Man, jeu vidéo des années 1980, est pour moi un bon point de départ. Pac Man est un personnage qui fait le tour d'un labyrinthe pour essayer d'avalier tous les monstres gloutons, et il ne peut le faire que dans certaines circonstances. Imaginez que le labyrinthe représente une cellule, Pac Man est alors le protéasome, un complexe important de cette cellule chargé de dégrader les protéines, ici représentées par les monstres gloutons. Le protéasome a besoin d'une autre protéine pour fonctionner : c'est E6-AP. Cette dernière est une enzyme qui est chargée de se lier à la protéine qui doit être éliminée du système. Elle opère donc une marque qui permettra de reconnaître que celle-ci doit subir une dégradation. Les protéines monstres gloutons à éliminer reçoivent une petite « queue », l'ubiquitine, et sont ainsi ubiquitinées.

Le western blot constitue une méthode d'identification des protéines qui vous est probablement familière. Dans notre blot, certaines protéines ont été ubiquitinées, selon le processus détaillé ce matin par Martin Scheffner. L'ubiquitination implique trois enzymes :

- la protéine E1, responsable de l'activation de l'ubiquitine ;
- la protéine E2, qui transfère l'ubiquitine de la protéine E1 jusqu'à la ligase E3 ;
- la ligase E3, dont il existe deux types : Les protéines E3 ring ligases et les protéines HECT E3 ligases.

La protéine ligase E3 se lie à la protéine E2 qui transfère directement l'Ubiquitine sur la protéine qui doit être dégradée. Dans un premier temps la protéine ligase HECT-E3 se lie à la protéine E2, et toutes deux recrutent l'Ubiquitine dans sa forme active ce qui va permettre de dégrader la protéine cible recrutée grâce à la ligase E3. La protéine E6-AP fait partie de la famille des protéines ligase avec un domaine HECT. Ainsi, grâce à ce système protéique complexe, la plupart du temps, le monstre glouton est mangé par Pac Man.

Pourquoi est-il si difficile de trouver les protéines cibles de la protéine E6-AP ?

La raison est que parmi la famille de protéines ligases avec HECT domaine dont fait partie E6-AP, elle est la seule à ne pas contenir de domaine d'interaction protéine-protéine dans sa structure. Cela donne la mesure de la difficulté à identifier ces protéines sans savoir où et comment elles se lient à E6-AP.

Jusqu'à présent, très peu de protéines ont été identifiées qui ont la caractéristique de se lier à E6-AP et très peu de domaines de liaison sont connus : on connaît les protéines HERC2 et E6, deux protéines de régulation qui se lient au domaine N-terminal de E6-AP alors que Ubch7, l'enzyme E2 spécifique se lient à la partie C-terminale sur le domaine HECT de E6-AP.

Au début de nos recherches, nous tâtonnions dans le noir. Nous avons fait appel à différentes techniques et modèles afin d'identifier davantage de cibles. Nous avons notamment utilisé la fameuse levure de pain avec une méthode de criblage double hybride. Vous pouvez imaginer que cette méthode s'apparente à la pêche, elle implique de lancer un appât en espérant attraper un poisson. La protéine E6-AP joue le rôle d'appât pour pêcher des protéines. La méthode a été mise au point avec des cellules issues d'un cerveau de souris et a conduit à « pêcher » six protéines qui interagissent avec la protéine E6-AP. Quatre d'entre elles ont été validées : les protéines UIP4, UIP3, UIP2 et UIP7. La protéine UPCH7 a également interagi avec l'E6AP, mais de manière spécifique.

Lorsque nous sommes malades, la faute incombe souvent aux bactéries. Cependant, ces dernières peuvent nous être utiles dans nos laboratoires dans la mesure où elles sont capables de produire des protéines. Nous avons adapté un système mis au point par un laboratoire israélien et nous l'avons adapté à nos propres objectifs. Il nous permet de produire des protéines dans une bactérie. Nous sommes donc capables de produire tous les éléments nécessaires au système de l'ubiquitination. Une fois la protéine cible et E6-AP produites, nous pouvons étudier leurs interactions. Nos expériences en laboratoire avec ce système montrent que sans E6AP, rien ne se passe.

Enfin, le dernier modèle que nous avons choisi utilise des cellules de mammifères. Le laboratoire de Martin Scheffner nous a fourni des cellules extrêmement utiles car toutes petites. Nous avons pris les formes actives et inactives de la protéine E6AP ainsi que celle de la protéine ring 1B, une des rares cibles bien connue d'E6AP. Nous avons déjà des résultats de cette expérience en ce qui concerne la forme active d'E6AP : le Pac Man mange le monstre glouton suite au processus d'ubiquitination. En revanche, avec la forme inactive d'E6AP, nous constatons une accumulation des protéines cibles dans la cellule car Pac Man ne peut dégrader ces dernières.

Nous avons ensuite mené des études pour identifier le domaine de liaison entre la protéine cible et E6AP. Nous avons une vague idée de la localisation du site de liaison. Nous avons donc isolé le domaine d'E6AP en question et l'avons fragmenté. Lorsqu'un des 76 premiers acides aminés est absent, l'interaction n'a pas lieu. Nous avons constaté que la liaison s'effectuait au niveau d'UIP4, d'UIP3 et d'UIP2. Plus récemment, nous avons découvert au sein des 76 premiers acides aminés une structure de liaison zinc. Extrêmement protégée, cette structure a été analysée et comparée aux autres protéines. Son interaction avec E6AP est très forte et laisse penser qu'il existe derrière cette interaction un mécanisme biologique important. Il convient donc d'en étudier les mécanismes.

Nous savons que certaines mutations du gène UBE3A qui produit normalement la protéine E6-AP entraînent le syndrome d'Angelman. La plupart des mutations de ce gène sont localisées dans le domaine HECT. D'autres mutations affectent la partie terminale de la protéine E6-AP, domaine potentiel de liaison à des protéines cibles. Nous avons ensuite étudié l'effet de certaines mutations sur E6-AP et recherché ses domaines de liaison avec certaines protéines cibles. Nous avons pu identifier trois domaines de liaison pour les protéines UIP2, UIP3 et UIP4.

Nos expériences sur les levures ont permis d'identifier trois protéines cibles qui pourraient potentiellement intervenir dans le développement du syndrome d'Angelman. Avec un système bactérien, nous avons prouvé que ces cibles interagissaient physiquement avec la protéine E6AP. Nous avons également montré que certaines cibles étaient ubiquitinées par E6AP. Enfin, nous allons étudier le rôle des protéines cibles nouvellement identifiées en coopération avec Ype Elgersma au centre médical Erasmus de Rotterdam.

Je remercie toute mon équipe ainsi que les personnes avec qui je travaille. Grâce à l'AFSA, nous rencontrons les personnes pour qui nous travaillons : vous et vos enfants.

Mécanismes de l'Empreinte du gène UBE3A

Angela MABB, Ph.D.

Je souhaite d'abord remercier les organisateurs de ces journées de m'avoir invitée. Je vais vous présenter mes travaux et ceux de mes collègues en particuliers des groupes de recherche dirigés par Ben Philpot et Mark Zylka. Je conclurai en abordant certains des développements thérapeutiques récents.

Post-doctorante au sein du laboratoire du Docteur Philpot, j'ai reçu une bourse pour identifier les traitements thérapeutiques potentiels pour le syndrome d'Angelman. Nous avons cherché à comprendre les fonctions du gène UBE3A et en particulier sa contribution au fonctionnement du cerveau et à son organisation.

Ce matin, nous avons entendu de nombreuses présentations sur le syndrome d'Angelman. Je n'évoquerai que brièvement le modèle murin et les stratégies envisagées pour le traitement thérapeutique. Je parlerai plus précisément de l'identification du Topotécan, inhibiteur de topoisomérases comme traitement potentiel. Enfin, j'aborderai brièvement certaines stratégies thérapeutiques mises au point à l'heure actuelle par les autres laboratoires.

Le génome contient à peu près 25 000 gènes et la plupart des troubles neurologiques sont la conséquence de mutations géniques. Le syndrome d'Angelman est lié à une anomalie moléculaire du gène UBE3A qui joue un rôle fondamental dans l'apparition du syndrome. La prévalence du syndrome d'Angelman est de l'ordre d'un enfant sur 15 000 naissances. Le syndrome d'Angelman et l'autisme constituent les deux facettes d'un même problème relatif au dosage génique du gène UBE3A.

Stormy Chamberlain a réalisé une excellente présentation sur les mécanismes de l'empreinte génomique parentale. La souris nous est très utile dans la mesure où les mécanismes d'empreinte de la souris et de l'humain sont similaires. Le gène UBE3A est exprimé à partir de l'allèle maternel dans le système nerveux central. L'anti-sens transcrit (ATS-UBE3A) bloque la transcription du gène UBE3A et met hors-service l'allèle paternel. Nous avons développé un modèle murin qui prend comme source un effet de l'hérédité : nous avons croisé une souris mâle normale avec une souris qui porte une mutation sur une des copies du gène UBE3A. La descendance conduit soit à une souris saine ayant hérité de deux exemplaires normaux d'UBE3A, la souris wild type ou souris sauvage, soit à une souris ayant hérité de la mutation de la mère. Cette dernière dispose d'un allèle paternel normal mais inactivé en raison du phénomène d'empreinte génomique. Je rappelle que ce phénomène ne se produit que dans les neurones. Dans les autres tissus de l'organisme, les deux allèles sont exprimés. Les signes cliniques constatés chez les individus atteints du syndrome d'Angelman sont liés au fait que le gène UBE3A n'est pas exprimé dans les neurones.

Dans le modèle murin que je vous présente, l'expression du gène UBE3A est confirmée expérimentalement par la coloration verte des cellules cérébrales chez la souris saine, (c'est un

procédé expérimental qui nous permet de mettre en évidence l'expression du gène associée à une coloration spécifique des cellules). Chez la souris mutante, l'allèle paternel est intact mais inactivé et nous constatons simplement une expression résiduelle du gène UBE3A localisée dans les cellules gliales du cerveau par leur coloration verte. Le syndrome d'Angelman est lié à un défaut de ce gène. On observe dans ce modèle murin que la structure du cerveau est bien intacte mais la communication entre les cellules ne s'effectue pas correctement. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les cellules du cerveau présentent une dégradation. En ce qui concerne le syndrome d'Angelman, la structure du cerveau étant conservée, cela nous donne l'opportunité d'essayer de réactiver le fonctionnement de ces zones du cerveau. Une autre approche pharmacologique peut également être envisagée comme par exemple un traitement par la L-dopa qui peut permettre au cerveau de retrouver un meilleur état fonctionnel.

L'objectif est donc de réactiver le gène UBE3A. Pour connaître son activité, nous avons commencé par effectuer son dosage par des méthodes à haut débit et à grand volume couplées à une technique d'imagerie. Nous avons déposé des neurones de souris dans une boîte de Pétri, dans laquelle des connexions entre neurones sont présentes. Ce système robotisé peut apporter des types de différents médicaments et des centaines de molécules peuvent y être criblées simultanément. Nous effectuons ce travail en collaboration avec le Docteur Brian Russ, dont le superbe laboratoire est comparable à celui d'une grande firme pharmaceutique. Nous avons de la chance d'avoir cet environnement à notre disposition.

Les neurones sont placés sur une plaquette dont les propriétés permettent le fonctionnement du mécanisme d'empreinte. Notre souris est assez particulière car elle dispose d'un marqueur qui devient vert lorsque la protéine est exprimée. Ainsi, lorsqu'une molécule active la transcription du gène UBE3A, la couleur verte apparaît. Nous avons effectué le criblage de 2 500 composés, dont un seul a permis à la couleur verte d'apparaître : un inhibiteur de topoisomérase, l'Irinotécan. Nous nous sommes donc penchés sur d'autres inhibiteurs de topoisomérase à notre disposition que nous avons administrés à des doses très élevées et qui ont conduit à la mort des cellules. Ils n'ont donc pas été retenus. Nous avons ensuite réduit les concentrations pour établir une courbe de réponse par rapport à la dose. La courbe permet de savoir quelle est la dose nécessaire d'un médicament donné pour obtenir le résultat recherché. En comparant la courbe de l'Irinotécan et celles de nombreuses autres molécules, nous constatons que le Topotécan est beaucoup plus efficace que l'Irinotécan. De plus, nous avons noté une toxicité moindre du Topotécan. Le Topotécan étant déjà utilisé dans le traitement de certains cancers, nous avons déduit qu'il était une bonne voie thérapeutique. Cependant, les inhibiteurs des topoisomérases présentent quelques problèmes.

Si le mécanisme de l'empreinte chez la souris est similaire à celui de l'humain, des différences existent dans d'autres domaines. Nous nous sommes donc posé la question de la pertinence de nos résultats s'ils étaient appliqués à l'homme. Nous avons tout d'abord souhaité analyser la durée de l'activation de l'expression du gène UBE3A avec le traitement. La meilleure administration actuelle du médicament s'effectue par voie intrathécale, c'est à dire par le biais de la moelle épinière. Le produit a été donc administré à des souris pendant deux semaines. L'étude des neurones du système

céphalo-rachidien montre que l'administration de Topotécan induit l'activité génique dans un premier sous-groupe de neurones. Cette activité dans ce sous-groupe dure environ un an.

Nous souhaitons prendre un certain recul et étudier l'action sur la topoisomérase (ainsi que les effets secondaires de cette molécule). Le domaine de l'oncologie et des neurosciences ont largement étudié cette molécule dans la mesure où elle fait partie de la chimiothérapie. En revanche, son action sur le système nerveux est encore inconnue et les études sur le sujet doivent être poursuivies afin de s'assurer que le traitement soit à la fois toléré et pérenne.

Le Topotécan est un inhibiteur de type 1. Les topoisomérases maintiennent la structure de l'ADN, qui est enroulé plusieurs fois sur lui-même. Pour accéder à l'ADN, il faut dérouler sa structure grâce à de petites coupures effectuées par des enzymes. Les inhibiteurs des topoisomérases s'intercalent au sein de ces coupures et en empêchent la réparation. Les cellules risquent de mal réagir à ce processus, ce qui implique d'effectuer des expériences.

Les topoisomérases jouent un rôle très important dans le maintien de l'expression des gènes et dans la réplication de l'ADN des cellules en division. Elles jouent également un rôle capital dans la régulation de l'expression des gènes, ce que nous avons montré au cours d'une autre étude. L'inhibition de la topoisomérase entraîne notamment une régulation négative massive (répression de l'activité) de grands gènes.

Afin d'étudier la fonction du Topotécan dans les neurones, nous avons commencé par nous poser quelques questions. Le Topotécan est-il présent dans le cerveau ? Si oui, y est-il exprimé ? Quelles sont ses cibles primaires ? Nous nous sommes donc penchés sur l'expression dans différentes régions du cerveau. Nous savons que les souris atteintes du syndrome d'Angelman présentent une perturbation de leur fonction corticale. Certains symptômes dans ce syndrome pourraient d'ailleurs être dus aux anomalies du développement des fonctions corticales. On a pu montrer que tous les neurones expriment la topoisomérase 1 dans un cerveau adulte. Ainsi, la cible thérapeutique existe bien: il s'agit de toutes les cellules de la zone corticale. Une administration correcte du produit devrait donc cibler tous les neurones du cerveau en vue d'activer le gène d'intérêt.

Nous nous sommes également penchés sur l'hippocampe, lieu de la mémoire. Tous les neurones de cette zone expriment la topoisomérase. Tous les neurones du cervelet, lieu de la coordination et de la motricité, expriment également cette protéine. Ainsi, chez l'adulte, la topoisomérase est exprimée par tous les neurones. Il est donc possible d'activer tous les neurones du cerveau si la cible thérapeutique est trouvée, ce qui est très prometteur.

Nous avons regardé la survie des neurones en cas d'administration de longue durée d'un certain produit. Les zones qui se colorent en vert sont celles où les cellules meurent. Aucune toxicité n'a été constatée pour des neurones traités in vitro avec le Topotécan pendant sept jours. Ainsi, le Topotécan ne fait pas mourir pas les neurones.

Dans le cerveau, les neurones sont connectés entre eux par des synapses qui propagent un signal d'un neurone à un autre, il existe via les synapses une communication entre les neurones et les cellules gliales également qui sont le support des neurones. Ces synapses tissent un réseau

complexe qui permet le fonctionnement global du cerveau. Ce réseau complexe peut être reproduit de manière simple en boîte de Pétri. Des injections de molécules permettent de déclencher des décharges et des signaux entre les neurones via les synapses. Dans le cas des neurones traités avec le Topotécan, la communication entre les neurones a été extrêmement réduite. Ainsi, le Topotécan interrompt apparemment l'activité synaptique. Et 24 et 48 heures plus tard, la communication entre les neurones est rétablie. Globalement, ces résultats sont plutôt prometteurs. En effet, dans certains tissus, l'activation peut durer un an. Si l'activité cérébrale est interrompue pendant un certain temps, il est possible de la récupérer ensuite. Ce phénomène, appelé syndrome du cerveau « chimiothérapeutique », a été observé chez certains individus traités avec le Topotécan.

Des stratégies de substitution sont à étudier. En collaboration avec Mark Cushman et Yves Pommier, nous avons étudié de nouvelles classes d'inhibiteurs de topoisomérases qui n'avaient encore jamais été utilisés. Nous avons remarqué que l'activation du gène UBE3A pouvait être induite par d'autres inhibiteurs que le Topotécan, ce qui est très prometteur. Ces composés sont actuellement étudiés pour savoir s'ils traversent la barrière hémato-encéphalique et s'ils permettent d'activer le gène UBE3A in vivo chez les animaux. La traversée de la barrière hémato-encéphalique est un problème majeur auquel sont confrontées de nombreuses firmes pharmaceutiques. Plusieurs études sont donc en cours sur ce sujet. Par ailleurs, les travaux d'Arthur Beaudet sur les oligonucléotides anti-sens ont des résultats très prometteurs. L'activation du gène UBE3A tel qu'il le propose a toutefois des inconvénients et doit être mise en place sur une très longue durée. Enfin, les traitements basés sur des vecteurs comme les adénovirus comme transporteur du gène normal pourraient permettre de réintroduire le gène UBE3A dans le cerveau. Le fait d'utiliser un virus de manière thérapeutique pose cependant le problème de son innocuité et de sa dissémination. Ceci doit pouvoir être contrôlé. Nous ne savons pas non plus quelle quantité de neurones est nécessaire pour restaurer une fonction normale?

Le Docteur Segal vous parlera de ses nucléases et notamment des TALEs, activateurs de la transcription potentiels de l'allèle paternel. L'administration de ces nucléases dans le cerveau peut poser certains problèmes et aucun essai clinique n'existe encore sur ce sujet. En outre, les nucléases entraînent des risques de perturbations de la réponse immunitaire.

Une nouvelle technologie appelée CRISPR est en train d'émerger. Ces CRISPR ont la faculté de délecter certains segments d'ADN. Cette technologie n'a fait encore l'objet d'aucun essai clinique et son action est irréversible.

Je remercie mon groupe de recherche ainsi que les membres du public. Nos expériences sur le processus de criblage étant extrêmement onéreuses, nous n'aurions pu mener de telles recherches sans le soutien de nos sponsors, que je remercie également.

Réactivation ciblée du gène UBE3A dans un modèle murin du syndrome d'Angelman

David SEGAL, PhD

Je remercie les organisateurs de cette journée de me donner l'opportunité de parler devant une audience de parents et familles. Un grand merci aussi à Angela d'avoir présenté certains aspects que j'aborderai également à mon tour.

Je ne suis pas neurologue ni pharmacologue et encore moins un véritable spécialiste du Syndrome d'Angelman mais ingénieur en biochimie. J'ai été contacté voici à peu près 5 ans par un groupe de parents et de chercheurs qui m'ont sollicité pour savoir s'il était possible d'utiliser une approche par la technologie dite en « doigt de zinc » que je maîtrise, pour traiter les patients atteints d'un syndrome d'Angelman. Comme à ce moment là, je ne connaissais pas cette maladie rare, je m'y suis intéressé pour savoir si ce type de technologie pouvait être utile.

Ce matin, nous avons entendu qu'il y a des périodes critiques pour le traitement. Il est très important que celui ci soit réalisé à un âge très précoce. Le rôle des parents est donc très important. Tout ce que vous faites est important même si vous ne le remarquez pas; mais quand vous échangez avec des chercheurs, vos remarques ou vos questions peuvent être une source d'idées pour notre communauté. J'espère pouvoir également apporter une pièce à cet édifice.

Chez les patients présentant un syndrome d'Angelman, la copie d'origine paternelle du gène UBE3A est inactivée par un long transcrite d'ARN, produit du gène Anti-sens d'UBE3A (ATS-UBE3A). En réactivant cette copie silencieuse, nous serons peut-être capables d'obtenir des résultats thérapeutiques. Les présentations de ce matin montrent une variété de nouvelles approches, chacune ayant ses propres avantages et sont de réels nouveaux défis. Je vais suivre de près le développement de chacune de ces approches qui n'existaient pas quand j'ai commencé à m'intéresser à ce sujet. La vitesse à laquelle ces recherches se sont développées est impressionnante.

Notre approche est d'essayer de comprendre comment la nature régule les gènes dans notre organisme. La régulation des gènes est un phénomène très complexe et met en jeu différents mécanismes qui permettent à nos cellules de choisir quels gènes elles activent ou pas. Ce phénomène d'activation se fait grâce à l'existence de facteurs de transcription qui sont des protéines. Ces facteurs de transcription ont la capacité de se lier à l'ADN et, en se fixant, créent une empreinte particulière dans un territoire ou domaine donné.

Le génome humain présente de nombreux facteurs de transcription; certains sont très communs et parmi eux, les facteurs de transcription à doigts de zinc. Notre groupe de recherche essaie de comprendre comment nos cellules au niveau moléculaire assurent cette fonction afin de pouvoir l'imiter in vitro dans nos laboratoires. On sait que ces facteurs de transcription s'enroulent autour d'un domaine ou territoire d'ADN particulier. Les sous-unités de ces protéines vont former un lien étroit

avec l'ADN. Autrement dit, ces protéines à doigts de zinc reconnaissent les bases de l'ADN via trois sous unités d'acides aminés. Nous pouvons donc imaginer de modifier ces trois éléments qui pourront reconnaître d'autres séquences d'ADN.

Dans les laboratoires de recherche, cette idée a permis de fabriquer de nouvelles protéines, des protéines que l'on a réussi à modifier. On a pu également étudier de plus près la structure des protéines, leurs différents domaines de liaison. Tous ces résultats rendent mes recherches plus efficaces. Les protéines à doigts de zinc sont produites dans la nature. En utilisant les technologies récentes, il est possible de les modifier pour les rendre plus efficaces, leur donner par exemple un nouveau domaine de fixation à une séquence d'ADN choisie. Nous pouvons parvenir à mettre au point un facteur de transcription artificiel activateur qui permettra de rendre fonctionnel le gène UBE3A en agissant directement sur lui. A l'inverse, on peut envisager de mettre au point un facteur dit répresseur pour cette fois-ci inactiver le gène Anti-sens et libérer le gène UBE3A de son action. Après plusieurs expériences différentes, nous avons été en mesure d'activer le gène UBE3A sur un modèle murin.

Nous avons été confrontés à une question classique en thérapie génique: nous avons mis au point un outil, mais comment pouvons-nous le faire pénétrer dans une cellule?

Cette protéine doit pouvoir entrer dans le noyau de la cellule, ce qui est envisageable par différents moyens comme des agents viraux par exemple. Le facteur limitant cette approche est le nombre de cellules que le virus qui transporte la protéine atteindra.

Le gène UBE3A a une expression dans tous les neurones, il faut donc choisir un facteur de diffusion qui atteigne la majorité des cellules. Pour cela, nous avons choisi les peptides qui ont cette capacité de pénétrer dans les cellules. La protéine qui nous intéresse est donc attachée à un peptide ce qui va lui permettre de traverser la membrane cellulaire. Mais, le deuxième obstacle est de franchir la barrière hémato-encéphalique (passage du sang au cerveau). Nos cerveaux ont une barrière qui sépare le sang du cerveau : c'est ce qui est appelé la barrière hémato-encéphalique car il est essentiel que certaines substances présentes dans le sang ne puissent pas entrer dans le cerveau. Comme cette barrière est constituée de cellules, il devrait être possible de la traverser. Nous avons injecté la protéine produite, S1 dans l'estomac de la souris. Sous une lumière Ultra-violet, nous pouvons suivre le trajet de cette protéine dans les tissus et particulièrement dans le cerveau. Nous avons montré que cette protéine a réussi à traverser la barrière hémato-méningée et nous avons observé qu'elle a agi puisque le gène UBE3A est exprimé. Nous avons ensuite regardé les effets de l'expression du gène chez la souris. Notre modèle murin fournit en fait peu d'informations sur l'action réelle de la protéine. Un autre écueil est la différence d'expression du gène UBE3A entre le modèle murin où il est très subtil et chez l'homme où il est plus sévère. Nous sommes donc en train de développer un nouveau modèle murin plus performant afin de tester nos hypothèses. J'espère être en mesure de revenir vers vous bientôt pour vous présenter un modèle murin plus en adéquation avec le comportement du syndrome d'Angelman que l'on observe chez l'homme. Il faudra également faire attention aux questions d'éthique médicale et à la réponse individuelle à ce traitement. Nous aimerions aller de l'avant très rapidement, mais avec prudence. Il est important que nous nous assurions que ce type de traitement est sûr et que les effets secondaires sont inoffensifs. Ce nouveau

modèle murin pourra probablement permettre d'identifier de nouvelles perspectives thérapeutiques. Et enfin, comme Angela Maab, nous pourrions être en mesure d'aborder l'étude des cellules humaines.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé dans mes recherches. Barbara, un post-doctorant qui travaille à mes côtés depuis cinq ans, a suivi ce projet de bout en bout. Pour réaliser ce travail, j'ai pu recevoir un financement du NIH et la Fondation Angelman Syndrome.