

Résumé d'un travail de recherche ayant reçu le soutien financier de l'AFSA

Etat d'avancement du projet intitulé : Potentiel du peptide inhibiteur de JNK dans le cadre de l'approche thérapeutique ciblant des défauts synaptiques dans le cadre du syndrome d'Angelman

Coordinateurs du projet :

Silvia Russo, Ph.D, IRCCS *Cytogenetics and Molecular Genetics Lab, Istituto Auxologico Italiano*, Milan, Italie

Tiziana Borsello, Professor of Human Anatomy Neuronal Death and Neuroprotection lab, IRCCS-Istituto Di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milan, Italie

1. Bref rapport concernant l'avancement du projet

Cette étude a pour but d'explorer le lien entre signalisation JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et syndrome d'Angelman (SA) dans un modèle de souris SA ainsi que sur des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPS) provenant de patients humains SA. Plus particulièrement, **le projet vise à analyser l'impact d'un peptide inhibiteur cellulaire perméable spécifique de la voie de signalisation JNK, appelé D- JNKI1, sur les conséquences du déficit en UBE3A**. Des résultats précédents rapportaient en effet que des souris modèles du SA présentaient une augmentation de l'activation de la voie de signalisation JNK. Dans un modèle murin de SA, cette activation se traduit par une augmentation de la phosphorylation (ajout d'un ou plusieurs phosphates) de la protéine c-Jun (par exemple d'un facteur 30 dans l'hippocampe). c-Jun est une protéine qui a un rôle dans la stimulation de l'expression des gènes cellulaires. Sa phosphorylation est ainsi susceptible de jouer un rôle sur son activité et donc sur l'expression d'un grand nombre de gènes, modifiant la physiologie des cellules.

Ainsi ce projet se décompose en deux parties : l'une menée dans un modèle animal *in vivo*, l'autre menée dans un modèle humain *in vitro*.

Modèle animal (Mario Negri) : l'équipe a obtenu les agréments pour réaliser un élevage de souris UBE3A^{tg}.

Modèle humain (*Istituto Auxologico Italiano*) :

La première étape a consisté à recruter des patients SA représentatifs des différents défauts génétiques impliqués dans le syndrome. Des cellules issues du sang de ces personnes ont été prélevées et soumises à un protocole permettant de générer des iPS (utilisation du virus de Sendai, non intégratif). Dans chaque cas, au moins trois clones ont été différenciés en neurones corticaux.

Pour le moment, les auteurs ont sélectionné :

- a) trois patients porteurs d'une mutation *UBE3A*, *UBE_1* (c.2506_2509del AAAG p.Lys836Arg fs X4), et un couple de jumeaux dizygotés *UBE_2f*, *UBE_2m*, (c.1039dupG p.Ala347Gly fs X25),
- b) un homme avec une délétion classique BP1-BP3 (*DEL_1*)

c) une fille avec un mosaïcisme de défaut d'empreinte (ID_1), qui montre une petite quantité de cellules normales. L'échantillon de cellules provenant de cette patiente est précieux, car il leur a permis d'isoler des clones iPSC normaux, fournissant le contrôle isogénique des dérivés neuronaux avec la mutation.

Une sœur sans syndrome du patient UBE_1 (C4) a été incluse dans l'étude en tant que contrôle. D'autres cellules contrôles sans lien avec ces échantillons ont été ajoutés.

Les auteurs prévoient de recruter d'autres patients et des contrôles familiaux pour créer une cohorte représentative de neurones AS-iPSC humains.

Un protocole d'induction d'iPS a été suivi (virus Sendai non intégratif). L'expression de marqueurs de cellules souches a été analysée. La présence de la mutation d'origine (le terme mutation est utilisé ici dans son sens génétique le plus large i.e. délétion, mutation ponctuelle...) a été vérifiée.

Les cellules souches ont ensuite été soumises à un traitement entraînant leur différenciation en neurones corticaux. L'expression de marqueurs spécifiques (ex : synaptophysine, GFAP) a été suivie au cours du processus de différenciation (sur une période d'au moins 100 jours).

Prochaines étapes :

- i) Constitution d'une cohorte de patients pour cette étude
- ii) Analyse de l'impact du traitement sur la morphologie des neurones à 42 jours et sur l'expression des gènes. Recherche de marqueurs permettant d'évaluer l'impact du traitement.

2. Etat d'avancement du projet par rapport à la proposition originale

(en référence au financement GANTT)

Modèle animal (Borsello) :

Tâche 1 : Caractérisation du comportement des souris Ube3a m- / p+ caractérisation comportementale dans 4 groupes d'étude

Les auteurs s'excusent pour le retard pris par cette partie du projet qui a du attendre de disposer de l'accord ministériel pour l'élevage des souris. L'élevage est en cours d'expansion.

Tâche 2 : Analyse de l'activation de JNK.

A faire

Modèle humain (Russo) :

Tâche 1 : Reprogrammation en CSPi et caractérisation

Nous avons reprogrammé et caractérisé deux patients et un contrôle. La caractérisation des clones iPSC de 3 patients supplémentaires est en cours.

Tâche 2 : différenciation des neurones corticaux et hippocampiques

Les auteurs ont obtenu des neurones corticaux d'un patient et son contrôle associé.

3. Les objectifs initiaux pourront-ils être atteints ? Justification

Modèle animal :

En raison du temps nécessaire pour l'obtention de l'autorisation ministérielle, les auteurs ont averti rapidement à M. Piersanti, qui a envoyé la communication à l'ASA pour demander un délai de six mois à partir du début du projet.

Modèle humain :

Le projet a commencé avec du retard et certains des patients sélectionnés vivent loin du laboratoire, ce qui nécessite un peu plus de temps pour gérer leur recrutement. Les objectifs indiqués seront nécessairement retardés

4. Est-ce que des résultats importants pour ce projet ont été publiés par d'autres groupes ?

Modèle humain :

Oui, James Fink a publié une évaluation électrophysiologique très intéressante des neurones dérivés de l'iPSC qui identifient des marqueurs. Les auteurs pourraient reproduire ce protocole et confirmer dans leur modèle la présence de ces marqueurs pour les utiliser pour analyser l'impact de l'inhibiteur de JNK.

5. Les objectifs initiaux doivent-ils être ajoutés ? Justification

Modèle animal :

Les auteurs ont besoin de plus de temps pour réaliser l'étude, et dépendent encore de l'efficacité de reproduction des souris de l'élevage pour disposer d'un nombre de souris suffisamment important pour réaliser cette étude.

Modèle humain :

À ce stade du démarrage et du développement du projet, les auteurs ne peuvent pas encore dire si les objectifs proposés doivent être ajustés ou non. Il se peut qu'ils ne parviennent pas à générer des iPS à partir de l'ensemble des échantillons initialement prévus, notamment en raison de difficulté de recrutement et de coûts.