

RÉFÉRENCES

- 7 Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 833-47.
- 8 Mura M, Hopkins TG, Michael T, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene* 2015 ; 34 : 5025-36.
- 9 Mitchell JK, Lemon SM, McGivern DR. How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer? *Curr Opin Virol* 2015 ; 14 : 101-8.
- 10 Lahali T, Michelet M, Zoulim F, et al. Netrin-1 protects against hepatocytic cell death through sustained translation during the unfolded protein response. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2016 ; 2 : 281-301.e9.
- 11 Berasain C, Avila MA. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 2014 ; 49 : 9-23.
- 12 Zoulim F, Liang TJ, Gerbes AL, et al. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut* 2015 ; 64 : 1824-33.

NOUVELLE

Implication de la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans le contrôle de la neurogenèse corticale

Sophie Laguesse^{1,2}, Catherine Creppe^{1,2}, Juliette D. Godin³, Laurent Nguyen^{1,2}

Le développement du cortex cérébral

Le cortex cérébral est la couche de matière grise qui recouvre les hémisphères cérébraux. Il est le siège des fonctions neurologiques élaborées comme le mouvement volontaire, le traitement des informations sensorielles, l'apprentissage ou encore la mémoire. Au cours de la corticogenèse, les progéniteurs neuronaux prolifèrent puis se différencient pour produire des neurones. Dans le cortex cérébral des rongeurs, on distingue essentiellement deux types de progéniteurs selon leur morphologie, l'expression de marqueurs moléculaires et leur mode de division : les progéniteurs apicaux (PA) et les progéniteurs intermédiaires (PI) [1]. Les premiers jours du développement cortical sont marqués par des étapes d'amplification des PA, au cours desquelles la majorité de ces progéniteurs se divisent au niveau de la surface apicale pour donner naissance à deux nouveaux PA. On parle alors de divisions « prolifératrices ». Plus tard au cours du développement, le mode de division des PA change. Grâce à des divisions dites « neurogéniques », un PA génère alors un nouveau PA ainsi qu'un autre type cellulaire différencié. Cette nouvelle cellule différenciée est soit un neurone soit un PI. Les PI se divisent ensuite à distance de la surface apicale et la plupart d'entre eux donnent naissance à

deux neurones. La production de neurones directement à partir de PA est appelée neurogenèse directe. La neurogenèse indirecte, elle, implique l'étape intermédiaire des PI et permet d'accroître le nombre de neurones produits par unité de temps et de surface [2] (Figure 1).

Le complexe Elongator

Elongator est un complexe macromoléculaire jouant un rôle critique dans la maturation des neurones de projection¹ [3, 4] (→).

Il est composé de deux copies de chacune de ses six sous-unités (EIp[Elongator complex protein]1 à EIp6). EIp1 est une protéine de structure essentielle à l'assemblage du complexe tandis qu'EIp3 est la sous-unité enzymatique présentant à la fois une activité d'acétyltransférase et de déméthylase [5, 6]. Le complexe Elongator est présent dans le noyau et dans le cytoplasme de tous les neurones corticaux ainsi que leurs progéniteurs, où il exerce différentes fonctions [7]. Une activité cytoplasmique majeure de ce complexe est son implication dans la maturation

¹GIGA-Neurosciences, université de Liège, CHU Sart Tilman, Avenue de l'Hopital, 1, Liège 4020, Belgique ;

²Interdisciplinary cluster for applied genoproteomics (GIGA-R), université de Liège, CHU Sart Tilman, Liège 4000, Belgique ;

³Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), Inserm U964, CNRS UMR7104, université de Strasbourg, Illkirch, France. sophie.laguesse@ucsf.edu

de certains ARN de transfert (ARNt). Plus particulièrement, Elongator est requis pour l'ajout d'un groupement chimique 5-méthoxycarbonylméthyl (mcm5) sur l'uridine présente en position 34 (U₃₄) de l'anticodon de certains ARNt. Cette modification est nécessaire pour assurer une traduction fidèle et efficace de l'ARN messager (ARNm) en protéine [8].

Elongator contrôle l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte

Afin d'étudier le rôle d'Elongator au sein des progéniteurs corticaux, nous avons créé un modèle murin d'inactivation conditionnelle de la sous-unité EIp3. Pour cela, nous avons croisé des souris transgéniques où une partie de la séquence codante d'EIp3 est flanquée de sites « loxp² » (EIp3lox/lox) avec des souris exprimant la recombinase Cre sous le promoteur de FoxG1, un gène exprimé par les progéniteurs de neurones corticaux (FoxG1Cre). Dans la lignée de souris transgéniques résultant de ce croi-

² Le système de recombinaison Cre-lox utilise l'enzyme recombinase Cre, une tyrosine recombinase issue du bactériophage P1, afin de cibler des séquences loxp (également issues du bactériophage P1), permettant ainsi d'activer, réprimer, voire même échanger, les gènes situés entre les séquences lox.

¹ Neurones dont l'axone va se projeter vers une ou plusieurs structures cérébrales à distance.

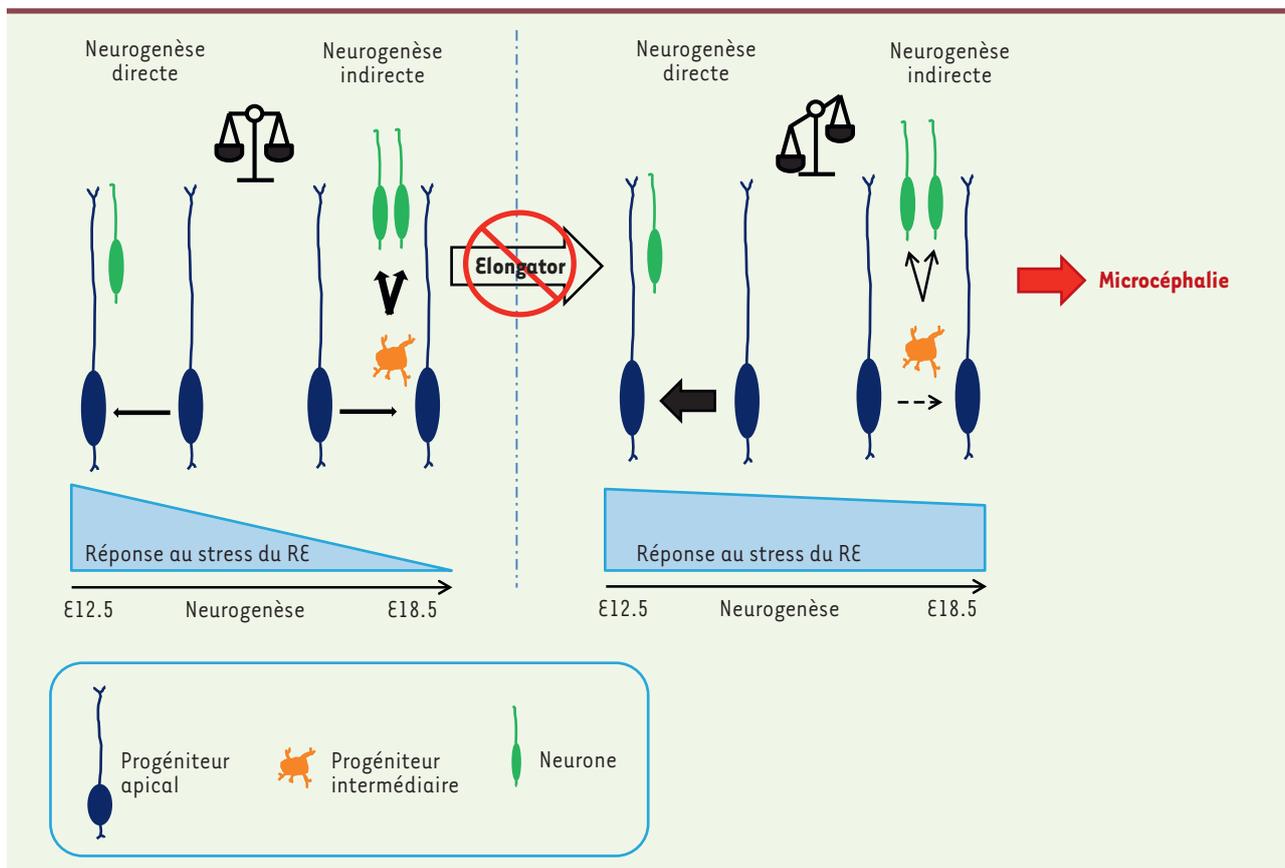


Figure 1. Modèle suggérant l'implication de l'UPR (réponse au stress du RE) dans le contrôle de la neurogenèse au cours du développement du cortex cérébral. En conditions normales (à gauche), on observe une diminution progressive de l'UPR dans les progéniteurs apicaux (PA) qui coïncide avec l'apparition de la neurogenèse indirecte. L'inactivation d'Elp3 dans les PA (à droite) provoque un défaut de traduction protéique responsable de l'accumulation de protéines mal repliées et d'un stress accru du RE. On observe alors une activation excessive de l'UPR qui dérègle l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte, conduisant *in fine* à un nombre réduit de PI et à la microcéphalie. E12.5 : jour 12.5 de l'embryogenèse ; Elp3 : *Elongator complex protein 3* ; PI : progéniteurs indirects ; RE : réticulum endoplasmique ; UPR : *unfolded protein response*.

sement (Elp3lox/lox;FoxG1Cre), Elp3 est ainsi invalidé de façon spécifique dans les progéniteurs neuronaux. Les souris déficientes en Elp3 présentent une microcéphalie³ sévère, causée par une réduction du nombre de neurones affectant toutes les couches du cortex. Nous avons analysé plus en détail les causes de cette microcéphalie et identifié une diminution spécifique de la population des PI. Grâce à la technique d'électroporation *in utero*⁴, nous avons suivi le destin cellulaire des

PA et démontré que l'absence d'Elp3 induit une augmentation de la neurogenèse directe aux dépens de la neurogenèse indirecte, menant ainsi à un nombre réduit de neurones et à une microcéphalie. Afin d'étudier cette fonction d'Elongator dans la neurogenèse, nous avons utilisé des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) pour modéliser la formation du tube neural en développement. Les cellules souches cultivées sur un tapis de cellules stromales⁵ forment ainsi des rosettes neurales en bordure desquelles sont présentes des cellules qui possèdent des caractéristiques semblables aux PA,

tandis qu'on retrouve en périphérie des cellules plus différenciées, comparables aux PI. L'inactivation d'Elp3 dans les hESCs provoque une réduction du nombre de PI dans les rosettes, produisant un phénotype comparable à celui observé lors de la corticogenèse murine. Après avoir étudié l'influence d'Elp3, nous nous sommes tournés vers l'étude d'Elp1. Chez l'homme, la dysautonomie familiale [4] (→) est une maladie héréditaire causée par une mutation du gène codant pour la sous-unité Elp1 [9]. Nous avons donc examiné la composition des rosettes formées à partir de cellules souches pluri-potentes induites (hiPSC) provenant de

(→) Voir la Nouvelle de C. Creppe et al., m/s n° 2, février 2010, page 135

³ Boîte crânienne de taille anormalement petite.

⁴ Technique consistant à injecter un fragment d'ADN directement dans le ventricule cérébral du cerveau des embryons à l'aide d'une micropipette. L'ADN est ensuite incorporé dans les progéniteurs corticaux bordant la lumière ventriculaire grâce à l'application locale d'un champ électrique.

⁵ Cellules issues de la moelle osseuse et ayant des propriétés de cellules souches.

fibroblastes de patients atteints de cette maladie. De même que pour les hESC déficientes en $\text{E}lp3$, nous avons observé, dans les rosettes déficientes en $\text{E}lp1$, une réduction de la production de PI par neurogenèse indirecte. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que l'expression et l'activité d'Elongator sont requises pour le maintien de l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte, à la fois dans le cortex cérébral murin en développement et dans le tissu neural dérivé de cellules souches humaines.

L'invalidation d'E $\text{lp}3$ provoque un stress du réticulum endoplasmique (RE), accroît l'UPR (réponse au stress du RE) et induit un défaut de neurogenèse

L'importance du complexe Elongator dans la modification des ARNt a été démontrée dans plusieurs modèles eucaryotes [10]. Nos résultats ont confirmé son implication dans la modification de l'uridine en position 34 (U_{34}) de certains ARNt au cours de la corticogenèse. En effet, en l'absence d'E $\text{lp}3$, les ribosomes marquent des pauses plus longues sur l'ARNm et cela spécifiquement sur les codons reconnus par les ARNt dont l' U_{34} est normalement modifiée par l'ajout d'un groupement chimique de type mcm5. Cette observation suggère un défaut de décodage entre le codon et l'anti-codon pouvant conduire à des problèmes de traduction protéique. En effet, il a récemment été montré chez les levures et les nématodes que l'absence de modification sur l' U_{34} est responsable non seulement d'un taux réduit de traduction protéique, mais également d'une accumulation de protéines agrégées [11]. Par microscopie électronique, nous avons mis en évidence des signes de stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les PA des animaux invalidés pour E $\text{lp}3$, indiquant une accumulation de protéines mal repliées, dont le nombre important excède celui des chaperonnes⁶ affectant ainsi leur bon

fonctionnement. La réponse cellulaire au stress du RE, appelée également UPR (*unfolded protein response*), peut se traduire par l'activation de plusieurs voies de signalisation permettant de lutter contre l'accumulation de protéines mal conformées afin de restaurer l'homéostasie cellulaire. Dans notre modèle, l'UPR se traduit par l'activation spécifique de la voie de signalisation régulée par PERK (*PKR[protein kinase RNA]-like endoplasmic reticulum kinase*), une protéine réceptrice du stress, présente dans la membrane du RE, qui active d'autres effecteurs dont eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit*) et ATF4 (*activating transcription factor 4*), et qui stimule notamment l'autophagie. L'analyse du cortex des animaux invalidés pour E $\text{lp}3$ a en effet démontré la présence de nombreux autophagolysosomes⁷ ainsi qu'une augmentation de l'expression d'eIF2 α et d'ATF4. Afin de déterminer si cette augmentation du stress du RE et sa transduction via l'UPR jouent un rôle dans les défauts de neurogenèse observés, nous avons bloqué la voie UPR incriminée en rétablissant les niveaux d'expression d'ATF4 dans le cortex d'embryons déficients en E $\text{lp}3$. Dans ces conditions, la production de PI par neurogenèse indirecte apparaît normale indiquant un rétablissement de l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte. Inversement, l'induction pharmacologique d'un stress du RE dans le cortex d'embryons sauvages par injection de tunicamycine⁸ provoque l'apparition de défauts de neurogenèse semblables à ceux observés en l'absence d'E $\text{lp}3$.

La régulation dynamique de l'UPR est nécessaire au contrôle de la neurogenèse corticale

Nos résultats montrent l'importance d'un contrôle précis de l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte au cours du développement du cor-

tex cérébral. L'invalidation d'Elongator dans les progéniteurs corticaux provoque des défauts de traduction protéique, causant un stress du RE accru et une sur-activation de l'UPR qui conduit à un dérèglement de l'équilibre neurogénique (*Figure 1*), induisant *in fine* une microcéphalie. De façon intéressante, en conditions physiologiques, nous avons observé, au cours du développement cortical, une diminution progressive de l'expression des effecteurs de l'UPR tels ATF4, ATF5 et CHOP (*C/EBP [CCAAT/enhancer binding protein] homologous protein*) qui coïncide avec la réduction progressive des divisions des PA par neurogenèse directe. De plus, l'invalidation d'ATF4 au début du développement cortical conduit à une réduction de la neurogenèse directe, mettant ainsi en évidence l'importance de l'UPR au cours de la neurogenèse. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent qu'une régulation dynamique des différentes composantes de l'UPR est nécessaire pour un contrôle précis de la neurogenèse corticale. \diamond

Unveiling the role of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cortical neurogenesis

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 ; 6 : 777-88.
2. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 136-44.
3. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 2009 ; 136 : 551-64.
4. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, et al. Elongator orchestrate the neurogenesis of the cortex cérébral. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 135-7.
5. Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, et al. Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 3517-22.
6. Okada Y, Yamagata K, Hong K, et al. A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* 2010 ; 463 : 554-8.

⁶ Protéines permettant la maturation d'autres protéines, notamment leur repliement correct.

⁷ Vacuoles d'autophagie.

⁸ Antibiotique provoquant l'UPR.



RÉFÉRENCES

- Nguyen L, Humbert S, Saudou F, Chariot A. Elongator – an emerging role in neurological disorders. *Trends Mol Med* 2010 ; 16 : 1–6.
- Grosjean H, de Crecy-Lagard V, Marck C. Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 252–64.
- Slaugenhaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, et al. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 598–605.
- Karlsborn T, Tukenmez H, Mahmud AK, et al. Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in eukaryotes. *RNA Biol* 2014 ; 11 : 1519–28.
- Nedialkova DD, Leidel SA. Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity. *Cell* 2015 ; 161 : 1606–18.

NOUVELLE

Les mutations du gène **NONO** sont responsables d'un nouveau syndrome de déficience intellectuelle lié au dysfonctionnement des synapses inhibitrices

Maéva Langouët¹, Dennis Mircsof^{2,3}, Marlène Rio¹, Jeanne Amiel¹, Steven A. Brown², Laurence Colleaux¹

¹ Inserm UMR 1163, laboratoire bases moléculaires et pathophysiologiques des désordres cognitifs, université Paris Descartes– Sorbonne Paris Cité, institut *Imagine*, hôpital Necker–Enfants Malades, 24, boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France ;
² Chronobiology and Sleep Research Group, Neuromorphology Group, Institute of Pharmacology, Inserm UMR 1163, Hôpital Necker Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France ;
³ Neuromorphology Group, Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Zurich, 190 Winterthurerstrasse, 8057 Zurich, Suisse.
maeva.langouet@gmail.com
laurence.colleaux@inserm.fr

Le terme déficience intellectuelle (DI) ne désigne pas une maladie unique mais un ensemble de pathologies extrêmement hétérogène ayant en commun un fonctionnement intellectuel général inférieur à la moyenne et des limitations du fonctionnement adaptatif¹ [13]. La prévalence de la DI est de 1 % si on ne considère que les DI sévères (quotient intellectuel [QI] inférieur à 50) et s'élève à 2–3 % si l'on inclut les DI légères (QI entre 50 et 70 [1]). De multiples causes, génétiques et environnementales, ont été recensées. Cependant, la grande majorité des DI légères et 40 % des DI sévères sont aujourd'hui encore inexplicables. Ces maladies neuro-développementales fréquentes et gravement invalidantes sont responsables de 10 % des dépenses de santé dans les pays développés, loin devant le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Il s'agit donc d'un enjeu scientifique et médical majeur [2] (→).

(→) Voir la Synthèse de S. Harel et S. Jenna, m/s n° 1, janvier 2011, page 70

Depuis 5 ans, la révolution génomique a conduit au développement de nouveaux outils de séquençage à très haut débit et de méthodes permettant de cibler des régions d'intérêt. De nombreuses applications médicales ont vu le jour depuis l'avènement de ces nouvelles techniques, qu'elles s'appuient sur l'analyse d'une sélection de gènes spécifiques ou le re-séquençage² de l'ensemble des régions codantes du génome humain (*whole exome sequencing* ou WES). Ces outils ont décuplé nos capacités à détecter des variations génétiques dans les gènes déjà associés à une maladie ou dans des gènes dont le rôle n'était pas suspecté, offrant une méthode de diagnostic efficace, rapide et économique des maladies rares. Dans le cadre des DI syndromiques³, elle permet ainsi d'identifier une cause génétique chez 50 % des patients [3].

Identification d'un nouveau gène impliqué dans la déficience intellectuelle : **NONO/P54NRB**

En collaboration avec les médecins du département de génétique de l'hôpital Necker–Enfants malades, nous avons eu l'opportunité d'étudier deux patients non apparentés présentant un phénotype très semblable. Ce phénotype est caractérisé par l'association d'une mégalencéphalie⁴, d'un corps calleux⁵ épais et d'une DI sévère et est désigné ci-après sous le nom de syndrome MCCDI (mégalencéphalie/corps calleux/DI). Ces patients souffrent également d'une hypoplasie malaire⁶ importante accompagnée de troubles sévères de l'élocution. Afin d'identifier le défaut génétique sous-jacent, nous avons utilisé une approche de WES et analysé les données à la recherche de mutations touchant le même gène chez les deux patients. Cette analyse nous a permis d'identifier

¹ Capacité de s'adapter aux demandes et contraintes de l'environnement.

² Séquençage lorsque la séquence du génome de référence est déjà connue.

³ Déficience intellectuelle associée à d'autres symptômes, physiques, neurologiques et/ou psychiatriques.

⁴ Augmentation du volume du cerveau.

⁵ Ensemble de fibres nerveuses reliant les deux hémisphères cérébraux.

⁶ Développement insuffisant de l'os de la pommette.