

Mutations du gène *EML1/Eml1*, progéniteurs neuronaux et hétérotopies chez l'homme et la souris

Michel Kielar^{1,2}, Françoise Phan Dinh Tuy³⁻⁵, Sara Bizzotto³⁻⁵, Richard Belvindrah³⁻⁵, Alexandre Croquelois^{1,2}, Fiona Francis³⁻⁵

¹Department of clinical neuroscience, Lausanne University Hospital, University of Lausanne, 1011 Lausanne, Suisse ;

²Department of fundamental neuroscience, University of Lausanne, 1005 Lausanne, Suisse ;

³Inserm UMR-S 839, 75005 Paris, France ;

⁴Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France ;

⁵Institut du Fer à Moulin, 17, rue du Fer à Moulin 75005 Paris, France.

fiona.francis@inserm.fr

michel.kielar@unil.ch



Le néocortex, formé de circonvolutions, constitue une partie importante du système nerveux central et présente une architecture laminaire complexe, qui résulte de processus développementaux embryonnaires finement orchestrés [1]. En effet, les neurones du néocortex sont tout d'abord générés par la prolifération de progéniteurs neuronaux qui bordent le ventricule, et ils migrent ensuite vers les zones superficielles (Figure 1) [2]. Finalement, les neurones vont migrer et atteindre la plaque corticale pour constituer les différentes couches du néocortex suivant un modèle *inside-out*, c'est-à-dire que les premiers neurones générés forment les couches profondes, alors que les derniers neurones traversent les couches précédentes pour atteindre les couches plus superficielles. Ces processus sont soumis à deux contraintes majeures :

1. Permettre l'expansion régulée d'un compartiment de cellules progénitrices, afin de produire juste le nombre suffisant de cellules nerveuses.

2. Contrôler finement le nombre final des trois types cellulaires principaux issus des progéniteurs : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes.

Ces deux événements résultent d'une régulation très précise de la division des cellules gliales radiaires, qui constituent la source majeure de progéniteurs du cortex en développement [3]. En effet, la glie radiaire donne naissance, par division asymétrique, à des cellules progénitrices intermédiaires, qui, à leur tour, par vagues successives, engendrent

des neurones par division symétrique. La glie radiaire a une morphologie particulière, arborant des prolongements, apicaux et basaux, attachés respectivement aux surfaces ventriculaires et piales. Ces prolongements sont importants pour le positionnement et le fonctionnement cellulaires. Le prolongement basal sert notamment de support à des neurones postmitotiques lors de leur migration [4].

Des anomalies de la prolifération des progéniteurs neuronaux, de la migration neuronale, de la croissance axonale et dendritique, et de la synaptogenèse peuvent entraîner des malformations corticales sévères, telles que la lissencéphalie de type 1 ou l'hétérotopie laminaire sous-corticale, qui sont associées à des déficits intellectuels et une épilepsie pharmaco-résistante [5]. Les mécanismes, moléculaires et cellulaires, ainsi que la physiopathologie de l'hétérotopie sous-corticale sont peu connus [6]. Même si des mutations ont été identifiées chez les patients dans les gènes *DCX* (*doublecortin*), *LIS1* (*lissencephaly*) et *TUBA1A* (*tubulin, alpha 1a*), dans un certain nombre de cas le gène muté n'est toujours pas connu.

La mutation *HeCo* (*heterotopic cortex*) est apparue spontanément dans une colonie de souris à l'Université de Lausanne [7]. Les souris mutantes possèdent des agrégats de neurones hétérotopiques dans la substance blanche (Figure 2), et souffrent d'épilepsie et de déficits cognitifs subtils, un phénotype semblable à celui qui est observé

chez les patients atteints d'hétérotopie sous-corticale [8]. Ce phénotype étant transmis de façon autosomique récessive chez la souris, nous avons réalisé des criblages génétiques en collaboration avec le centre national de génotypage (CNG, Evry, R. Olaso). Grâce à la technique des *single nucleotide polymorphisms* (SNP) qui couvrent le génome entier, nous avons localisé la région chromosomique contenant le gène muté. Nous avons également comparé le transcriptome de cerveaux d'embryons mutants à celui de cerveaux d'embryons de type sauvage. Nous avons ainsi identifié le gène *Eml1* (*Echinoderm microtubule associated protein-like 1*), présent dans la région candidate, dont l'expression est fortement réduite dans les cerveaux mutants [9]. De plus, une analyse de l'ADN génomique *HeCo* a montré l'insertion d'un rétrotransposon [10] qui perturbe la transcription du gène *Eml1*. Parallèlement, en collaboration avec les groupes de J. Chelly et N. Bahi-Buisson (Paris) et A-G Le Moing et P. Berquin (Amiens), nous avons analysé le gène humain, *EML1*, en cherchant des mutations de ce gène dans un panel de patients atteints de malformations corticales, mais dont les gènes *DCX*, *LIS1* et *TUBA1A* n'étaient pas mutés. Des mutations ont été d'abord identifiées dans une famille présentant une hétérotopie « géante » sévère (Figure 2) [11] avec une polymicrogyrie (caractérisée par des petites girations

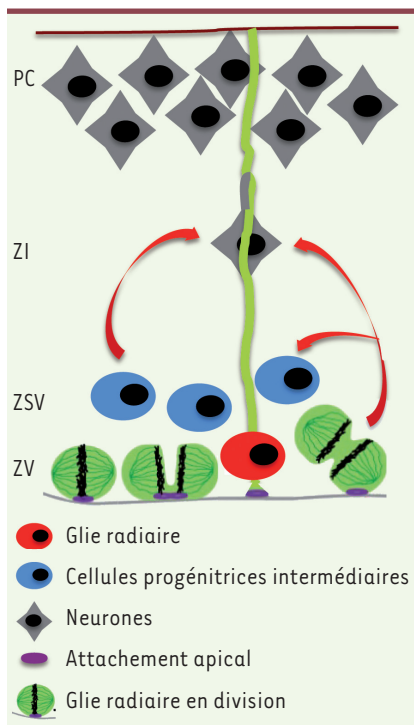


Figure 1. Schéma d'une section de la paroi corticale embryonnaire. Les progéniteurs neuronaux (rouges, verts et bleus) se trouvent dans les zones ventriculaire (ZV) et sous-ventriculaire (ZSV) et produisent des neurones (gris) qui migrent à travers la zone intermédiaire (ZI) afin d'atteindre la plaque corticale (PC). Les cellules gliales radiaires se divisent à la surface ventriculaire d'une manière symétrique, en donnant naissance à deux cellules filles identiques, ou asymétrique, en donnant naissance à deux cellules différentes [15]. Une ou deux cellules filles bénéficient de la membrane apicale (violet) qui borde le ventricule. Les cellules gliales radiaires ont un prolongement apical attaché à la surface ventriculaire et un long prolongement basal attaché à la surface piale du cortex. Ce dernier sert de guide aux neurones pour atteindre la PC.

fusionnées), associées à des anomalies du corps calleux. Une deuxième famille avec un phénotype similaire a été par la suite identifiée en collaboration avec le groupe de G. Mancini (Pays-Bas). Les enfants atteints présentent tous un retard développemental et mental, et une épilepsie, parfois pharmaco-résistante, se développe souvent pendant la première décennie.

Le gène *Eml1* appartient à une famille codant pour des protéines qui se lient aux microtubules [12, 13] et qui sont peu étudiées dans les neurones. Ceci renforce l'idée selon laquelle un fonctionnement anormal du cytosquelette est une cause majeure de la formation de l'hétérotopie [14]. D'une manière intéressante, l'expression du gène *Eml1* a été localisée par hybridation *in situ* dans les neurones postmitotiques de la plaque corticale, ainsi que dans les cellules en prolifération de la zone ventriculaire. L'étude des cerveaux *HeCo* a, par ailleurs, révélé la présence de progéniteurs ectopiques et une prolifération perturbée durant l'embryogenèse. Grâce à la vidéo-microscopie et à des expériences de greffe de cellules neuronales (réalisées respectivement avec l'aide des groupes de C. Lebrand, Lausanne, et de V. Borrell, Alicante), nous avons pu montrer que, dans un environnement de type sauvage, les cellules mutées migrent aussi bien que les cellules de type sauvage. L'hétérotopie est donc vraisemblablement due à des anomalies plus précoces du développement cérébral, notamment au niveau de la localisation et de la prolifération des progéniteurs neuronaux, résultant en une production locale et ectopique de neurones dans la région de l'hétérotopie, avec une perturbation du substrat de migration (Figure 3).

En résumé, nous avons identifié *EML1/Eml1*, une protéine au rôle insoupçonné dans la corticogenèse, et dont la fonction exacte est inconnue. La mutation du gène est clairement responsable d'anomalies des progéniteurs neuronaux, susceptibles d'avoir des conséquences secondaires sur la migration neuronale. Finalement, en cherchant les partenaires protéiques de *Eml1*, et grâce aux techniques d'imagerie sur des cerveaux en développement, nous essayons maintenant de comprendre le rôle de cette protéine et de savoir comment son inactivation conduit à l'hétérotopie. ♦

Mutations in *Eml1/EML1* lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human

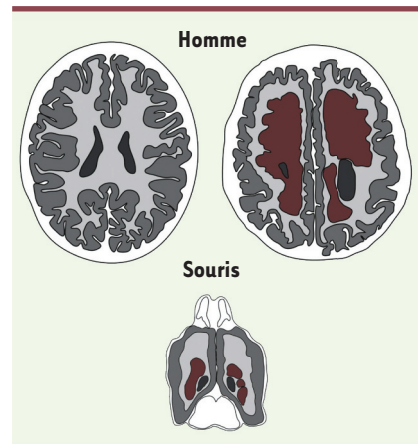


Figure 2. Schéma de coupes horizontales de cerveaux adultes humains (haut) et murin (bas). Les patients qui portent des mutations dans *EML1* (droite) présentent une hétérotopie neuronale (marron ; localisation anormale de neurones organisés en agrégats) localisée dans la substance blanche (gris clair), par comparaison aux sujets contrôles (gauche). Les ventricules latéraux sont en noir et la substance grise en gris foncé. Les patients peuvent aussi présenter une macrocéphalie, une hydrocéphalie et/ou une polymicrogyrie. Le phénotype d'hétérotopie est également observé dans le cerveau de souris mutantes.

LIENS D'INTÉRÊT

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

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier toutes les autres personnes impliquées dans cet article, Marika Nosten-Bertrand pour sa lecture, le programme Inserm Avenir, l'agence nationale de la recherche (ANR-08-MNP-13, ANR-13-BSV4-0008-01), la Fondation Bettencourt Schueller, et la Fédération pour la recherche sur le cerveau, le Fonds national suisse de la recherche scientifique (SNCF31003A-135574, SPUM-33CM30-124089 et 33CM30-140332) et la Fondation Gianni Biaggi de Blasys. L'équipe de FF est affiliée à l'École des neurosciences de Paris et au laboratoire d'excellence (Labex) Bio-Psy.

RÉFÉRENCES

1. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 2011 ; 146 : 18-36.
2. Kerjan G, Gleeson JG. Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends Genet* 2007 ; 23 : 623-30.

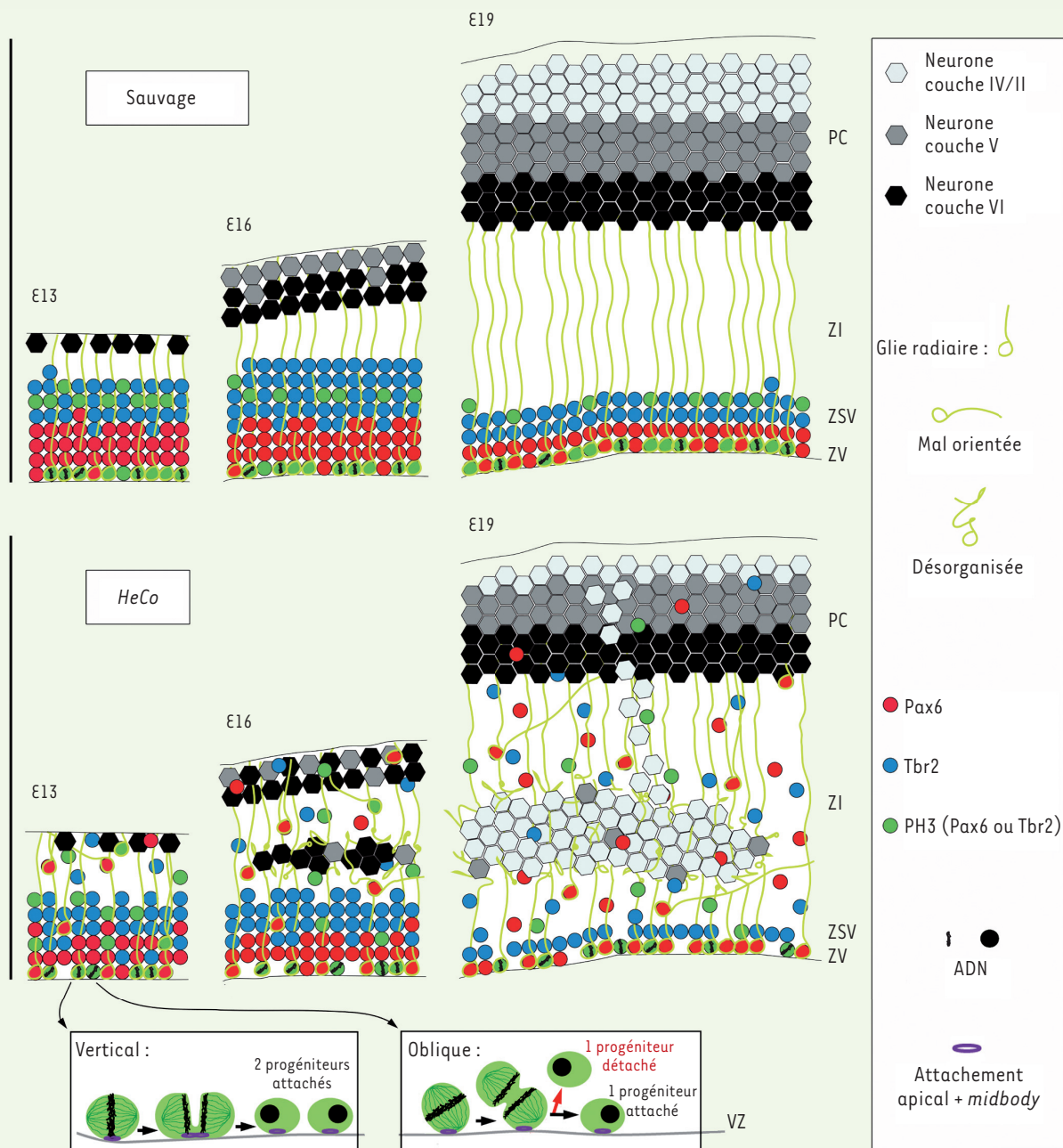


Figure 3. Schéma de la formation d'hétérotopie dans les cerveaux de souris mutantes HeCo. Le schéma compare le développement cortical à E13, E16 et E19 (E, nombre de jours embryonnaires) de souris mutantes (bas) et de souris sauvages (haut). Dans les cerveaux de type sauvage, les progéniteurs (positifs pour Pax6 ou Tbr2, respectivement en rouge et bleu, ou parfois en mitose et exprimant PH3, en vert) sont restreints à la ZV (zone ventriculaire) et la ZSV (zone sous-ventriculaire), tandis que dans les cerveaux HeCo, dès E13, une proportion de progéniteurs est distribuée anormalement dans la ZI (zone intermédiaire) et la PC (plaque corticale). À E16, une accumulation de cellules est visible dans la ZI, et les prolongements de cellules gliales radiaires sont perturbés. Des colonnes de neurones sont présentes entre l'hétérotopie et la PC aux stades plus tardifs, quand l'hétérotopie ne contient que des neurones des couches superficielles. En bas de la figure, une illustration de clivages mitotiques verticaux et obliques à la surface ventriculaire est détaillée. Les progéniteurs HeCo, mutés pour *Eml1*, montrent une augmentation relative des clivages obliques, qui vont vraisemblablement modifier la présence de la membrane apicale reçue par la cellule et mener à un nombre plus important de progéniteurs détachés qui continuent à se diviser dans des zones ectopiques [16].

RÉFÉRENCES

3. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 ; 6 : 777-88.
4. Malatesta P, Götz M. Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development* 2013 ; 140 : 483-6.
5. Francis F, Meyer G, Fallet-Bianco C, et al. Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur J Neurosci* 2006 ; 23 : 877-93.
6. Chevassus-au-Louis N, Represa A. The right neuron at the wrong place: biology of heterotopic neurons in cortical neuronal migration disorders, with special reference to associated pathologies. *Cell Mol Life Sci* 1999 ; 55 : 1206-15.
7. Croquelois A, Giuliani F, Savary C, et al. Characterization of the HeCo mutant mouse: a new model of subcortical band heterotopia associated with seizures and behavioral deficits. *Cereb Cortex* 2009 ; 19 : 563-575.
8. Harding B. Gray matter heterotopia. In : Guerrini R, Andermann F, Canapicchi R, Roger J, Zifkin BG, Pfanner P, eds. *Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy*. Philadelphia, USA : Lippincott-Raven, 1996 : 81-8.
9. Kielar M, Phan Dinh Tuy F, Bizzotto S, et al. Mutations in Eml1 lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat Neurosci* 2014 ; 17 : 923-33.
10. Baust C, Gagnier L, Baillie GJ, et al. Structure and expression of mobile EtNII retroelements and their coding-competent MusD relatives in the mouse. *J Virol* 2003 ; 77 : 11448-1158.
11. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, et al. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* 2012 ; 135 : 1348-69.
12. Suprenant KA, Dean K, McKee J, Hake S. EMAP, an echinoderm microtubule-associated protein found in microtubule-ribosome complexes. *J Cell Sci* 1993 ; 104 : 445-50.
13. Eichenmüller B, Everley P, Palange J, Lepley D, Suprenant KA. The human EMAP-like protein-70 (ELP70) is a microtubule destabilizer that localizes to the mitotic apparatus. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 1301-9.
14. Jaglin XH, Chelly J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet* 2009 ; 25 : 555-66.
15. Kosodo Y, Röper K, Haubensak W, et al. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J* 2004 ; 23 : 2314-24.
16. Konno D, Shioi G, Shitamukai A, et al. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 93-101.



Toujours d'actualité
volume 25
www.medecinesciences.org

ANTICORPS MONOCLONAUX EN THÉRAPEUTIQUE

De la conception à la production
La réalité clinique
Un futur en développement

Coordinateurs : Alain Beck,
Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier



Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans M/S

Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans *Médecine/Sciences*. Pourquoi un numéro spécial de *Médecine/Sciences* sur les anticorps monoclonaux thérapeutiques ? Il nous a semblé que le moment était venu de dresser un état des lieux de ces biomédicaments qui prennent désormais une place considérable - et croissante - dans les traitements de maladies souvent lourdes et désespérantes. Ce voyage que nous vous proposons à la découverte du monde des anticorps thérapeutiques nous a appris, ou plutôt rappelé, une évidence : les compétences en France sont fortes et nombreuses, qu'elles soient académiques ou industrielles, biotechnologiques ou cliniques. Le paysage français, trop longtemps discret, bruisse désormais de mille initiatives balayant de multiples aspects des anticorps thérapeutiques : études précliniques et cliniques menées avec de nouveaux anticorps dirigés contre des cibles originales, développement de nouveaux formats d'anticorps ou d'anticorps optimisés reposant sur des études structurales et fonctionnelles sophistiquées, recherche active de cibles pertinentes, mise au point de méthodologies de bioproduction, de couplage, etc. L'expansion industrielle rapide de ce champ est un défi que peut et doit relever notre pays, défi tant scientifique qu'économique, avec ses combats pour la propriété intellectuelle et pour l'emploi de nos jeunes scientifiques.

Alain Beck, Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier

Bon de commande

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex, France

Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir **M/S n° 12 - décembre 2009 (Anticorps monoclonaux en thérapeutique)** : 25 € + 3 € de port = **28 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

Signature :