### Avis de Soutenance

### Madame Lucile BRUN

## Biologie-Santé - Spécialité Génétique

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Les Encéphalopathies Épileptiques Développementales Néonatales liées à KCNQ2 : caractérisation de modèles murin et cellulaires.

#### dirigés par Monsieur Laurent VILLARD

Soutenance prévue le vendredi 24 mars 2023 à 14h00 Lieu : Faculté de médecine de La Timone, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Salle : de thèse n°2

#### Composition du jury proposé

M. Laurent VILLARD	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse
M. Vincent EL GHOUZZI	UMR1141 - Inserm-Université de Paris - NeuroDiderot	Rapporteur
Mme Amélie PITON	Unité de Génétique Moléculaire - Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)	Rapporteure
Mme Julie PEYRONNET- ROUX	UMR 7289 - Plasticité et Physio-Pathologie des réseaux moteurs rythmiques (P3M) - Institut de Neurosciences de la Timone	Examinatrice
M. Edor KABASHI	Recherche translationnelle sur les maladies neurologiques, Institut Imagine, INSERM UMR 1163	Examinateur
M. Mathieu MILH	Service de neurologie pédiatrique - Pédiatrie spécialisée et médecine infantile - CHU de Marseille - Hôpital de la Timone	Examinateur

Mots-clés: DEE, modèle murin, KCNQ2, omiques, IPSc, neurones humains

#### Résumé:

Les Encéphalopathies Épileptiques Développementales Néonatales (NEO-DEE) sont des syndromes épileptiques rares dont l'origine peut être génétique. Elles sont caractérisées par des crises d'épilepsie pharmacorésistantes qui surviennent dès la première semaine de vie jusqu'à 3 à 6 mois, associées à un EEG intercritique anormal. Le pronostic est péjoratif avec une mortalité de 30% des patients durant l'enfance ou une évolution vers un polyhandicap sévère lié à des déficits moteurs et cognitifs. Le caractère sporadique de la pathologie et les manifestations épileptiques qui ne sont visibles qu'à la naissance, ne permettent pas de prédire cette pathologie, et le diagnostic prénatal n'est pas possible. Ne disposant d'aucun traitement efficace, les NEO-DEE sont, à ce jour, un sujet de recherche translationnelle. Le gène KCNQ2 est l'un des gènes les plus fréquemment impliqués dans les NEO-DEE. Ce gène code pour la sous-unité Kv7.2 des canaux potassiques qui contrôlent l'excitabilité neuronale via le courant M. Les analyses fonctionnelles ont révélé que les conséquences des variants pathogènes de KCNQ2 sur le courant M pouvaient être multiples. Les modèles cellulaires et

murins se sont ainsi multipliés dans la littérature. Bien que tous ces modèles aient permis d'enrichir les connaissances de la fonction de KCNQ2 et du courant M, les modèles cellulaires étaient hétérologues et les modèles murins étaient porteurs de variants bénins ou s'exprimant de façon non physiologique. Des modèles reproduisant plus fidèlement la pathologie des patients étaient donc nécessaires. Mon équipe d'accueil a créé un modèle murin et trois lignées neuronales qui portent tous à l'état hétérozygote un variant pathogène retrouvé chez des patients ayant une forme sévère de KCNQ2-NEO-DEE. Bien qu'il ait été montré que les déficits cognitifs puissent être indépendants de l'état épileptique, nous ne pouvons pas dissocier clairement l'impact du variant lui-même de celui des crises d'épilepsie. La disparition de ces crises après 3 mois de vie alors que le variant est toujours présent, pose également question. Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, nous avons voulu caractériser nos modèles de plusieurs façons : le transcriptome et le protéome du cortex préfrontal de la souris ont été analysés à plusieurs périodes de son développement. Ces analyses avaient pour but de mettre en évidence d'éventuelles dérégulations liées à la pathologie et une modulation d'expression de gènes susceptible d'être à l'origine d'une compensation moléculaire qui expliquerait la rémission des crises d'épilepsie. Ces mêmes analyses multi-omiques ont été réalisées dans un modèle de neurones corticaux de patients dérivés de cellules pluripotentes induites afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications d'expression de gènes dans un modèle humain. La compréhension des mécanismes pathologiques de KCNQ2-NEO-DEE pourrait contribuer à améliorer la prise en charge thérapeutique. J'ai donc développé, en parallèle du travail précédent, un protocole de déclenchement à volonté de crises d'épilepsie par émission d'ultrasons chez la souris modèle. L'étude de l'évolution de la sensibilité à ces crises audiogènes et la caractérisation immunohistologique de l'hyperexcitabilité des régions du cerveau, sont désormais susceptibles d'être utilisées pour tester l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques dont la mise en place reste l'objectif principal de mon équipe. Dans leur ensemble, ces travaux ont pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension des KCNQ2-NEO-DEE à travers des modèles nouveaux et pertinents et de participer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients.

LE DOXEN

Georges LEONETTI

# Résumé

Les Encéphalopathies Épileptiques Développementales Néonatales (NEO-DEE) sont des syndromes épileptiques rares dont l'origine peut être génétique. Elles sont caractérisées par des crises d'épilepsie pharmacorésistantes qui surviennent dès la première semaine de vie jusqu'à 3 à 6 mois, associées à un EEG intercritique anormal. Le pronostic est péjoratif avec une mortalité de 30% des patients durant l'enfance ou une évolution vers un polyhandicap sévère lié à des déficits moteurs et cognitifs. Le caractère sporadique de la pathologie et les manifestations épileptiques qui ne sont visibles qu'à la naissance, ne permettent pas de prédire cette pathologie, et le diagnostic prénatal n'est pas possible. Ne disposant d'aucun traitement efficace, les NEO-DEE sont, à ce jour, un sujet de recherche translationnelle.

Le gène KCNQ2 est l'un des gènes les plus fréquemment impliqués dans les NEO-DEE. Ce gène code pour la sous-unité Kv7.2 des canaux potassiques qui contrôlent l'excitabilité neuronale via le courant M. Les analyses fonctionnelles ont révélé que les conséquences des variants pathogènes de KCNQ2 sur le courant M pouvaient être multiples. Les modèles cellulaires et murins se sont ainsi multipliés dans la littérature. Bien que tous ces modèles aient permis d'enrichir les connaissances de la fonction de KCNQ2 et du courant M, les modèles cellulaires étaient hétérologues et les modèles murins étaient porteurs de variants bénins ou s'exprimant de façon non physiologique. Des modèles reproduisant plus fidèlement la pathologie des patients étaient donc nécessaires. Mon équipe d'accueil a créé un modèle murin et trois lignées neuronales qui portent tous à l'état hétérozygote un variant pathogène retrouvé chez des patients ayant une forme sévère de KCNQ2-NEO-DEE.

Bien qu'il ait été montré que les déficits cognitifs puissent être indépendants de l'état épileptique, nous ne pouvons pas dissocier clairement l'impact du variant lui-même de celui des crises d'épilepsie. La disparition de ces crises après 3 mois de vie alors que le variant est toujours présent, pose également question. Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, nous avons voulu caractériser nos modèles de plusieurs façons : le transcriptome et le protéome du cortex préfrontal de la souris ont été analysés à plusieurs

périodes de son développement. Ces analyses avaient pour but de mettre en évidence d'éventuelles dérégulations liées à la pathologie et une modulation d'expression de gènes susceptible d'être à l'origine d'une compensation moléculaire qui expliquerait la rémission des crises d'épilepsie. Ces mêmes analyses multi-omiques ont été réalisées dans un modèle de neurones corticaux de patients dérivés de cellules pluripotentes induites afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications d'expression de gènes dans un modèle humain.

La compréhension des mécanismes pathologiques de *KCNQ2*-NEO-DEE pourrait contribuer à améliorer la prise en charge thérapeutique. J'ai donc développé, en parallèle du travail précédent, un protocole de déclenchement à volonté de crises d'épilepsie par émission d'ultrasons chez la souris modèle. L'étude de l'évolution de la sensibilité à ces crises audiogènes et la caractérisation immunohistologique de l'hyperexcitabilité des régions du cerveau, sont désormais susceptibles d'être utilisées pour tester l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques dont la mise en place reste l'objectif principal de mon équipe.

Dans leur ensemble, ces travaux ont pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension des *KCNQ2*-NEO-DEE à travers des modèles nouveaux et pertinents et de participer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients.

# **Abstract**

Neonatal Developmental Epileptic Encephalopathies (NEO-DEE) are rare epileptic syndromes that may have a genetic origin. They are characterized by drug-resistant epileptic seizures that occur from the first week of life up to 3 to 6 months, associated with an abnormal interictal EEG. The prognosis is poor with a mortality rate of 30% of patients during childhood or a progression to multiple disabilities including cognitive deficits. The sporadic nature of the disease and the epileptic manifestations that are only visible at birth, do not allow to predict its occurrence, and prenatal diagnosis is not possible. With no efficient treatment available, NEO-DEE is, to date, a subject of translational research.

The *KCNQ2* gene is one of the most frequently involved gene for NEO-DEE. This gene encodes the Kv7.2 subunit of potassium channels that control neuronal excitability via the M current. Functional analyses revealed that the consequences of pathogenic variants of *KCNQ2* on the M current could be multiple. Cellular and mouse models have thus multiplied in the literature. Although all these models have increased the knowledge on the function of *KCNQ2* and the M current, these cellular models were heterologous, and the murine models presented benign, or variants expressed in a non-physiological context. More relevant models were therefore needed. My host team has produced a mouse model and three neuronal lines that all carry heterozygous pathogenic variants found in patients with a severe form of *KCNQ2*-NEO-DEE.

Although it has been shown that cognitive deficits can be independent of the epileptic state, we cannot clearly dissociate the impact of the variant itself from that of the epileptic seizures. The fact that seizures stop after 3 months of life while the variant is still present also asks questions. To provide some answers, we characterized our models in several ways: the transcriptome and the proteome of the mouse prefrontal cortex were analyzed at several periods of its development. The aim of these analyses was to identify the molecular consequences of Kcnq2 mutations. We also looked for a modulation of gene expression that could create a compensation and the remission of epileptic seizures. These same multi-omics analyses were performed in a model of patient cortical neurons