



RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

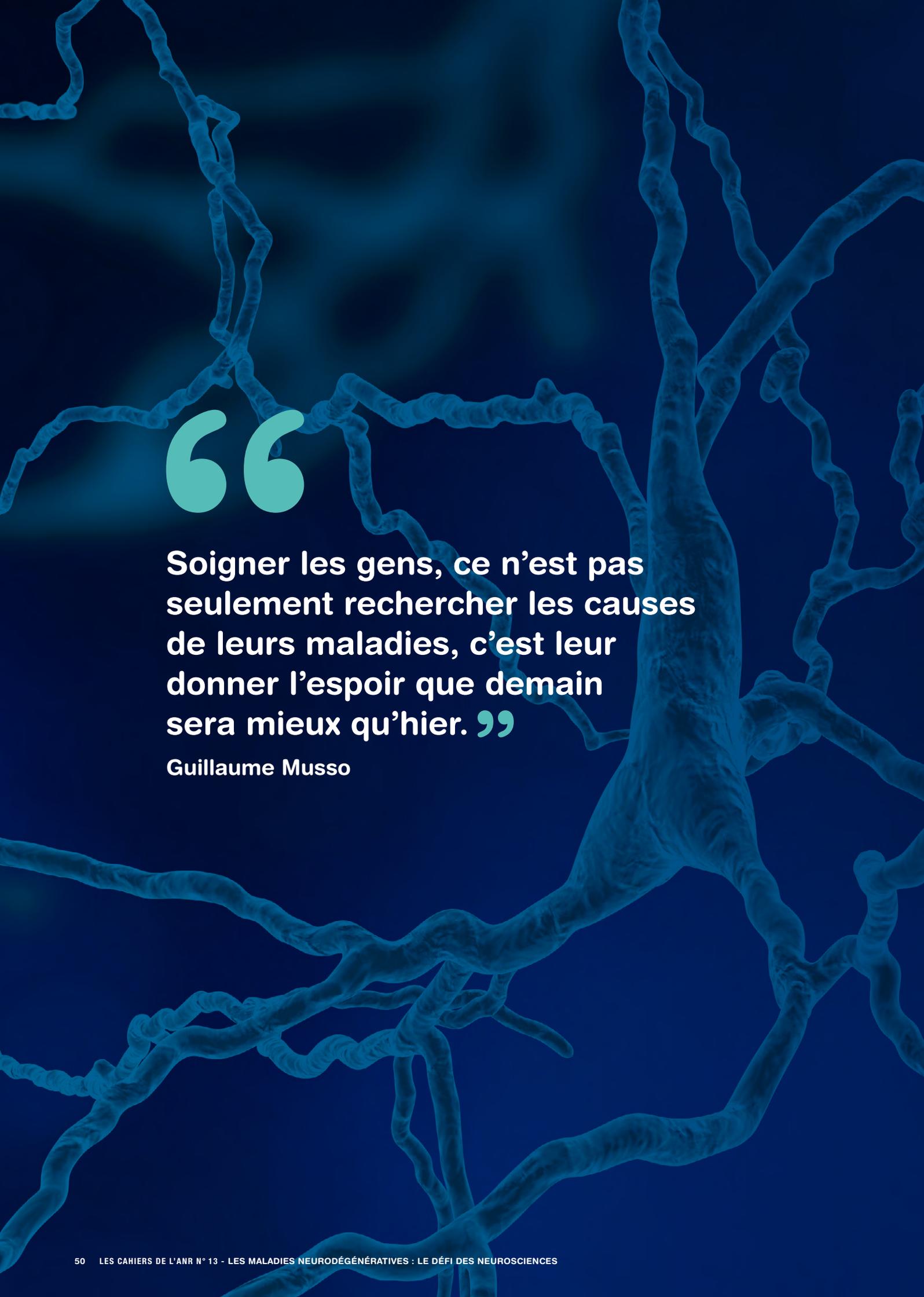
**anr** ©  
agence nationale  
de la recherche



LES CAHIERS DE L'ANR N° 13 - DÉCEMBRE 2020

# LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES : LE DÉFI DES NEUROSCIENCES

Projets financés sur la période 2010 – 2018



“

**Soigner les gens, ce n'est pas seulement rechercher les causes de leurs maladies, c'est leur donner l'espoir que demain sera mieux qu'hier. ”**

**Guillaume Musso**

## PARTIE 5.

# PANORAMA DES PROJETS SCIENTIFIQUES FINANCÉS

Maladie de Parkinson	p. 52
Maladie d'Alzheimer et Tauopathies	p. 64
Maladie d'Huntington	p. 92
Démences Fronto-Temporales	p. 100
Sclérose en Plaque	p. 104
Maladies à Prions	p. 109
Innovations technologiques	p. 112

L'ANR remercie les porteurs qui ont fourni les informations pour la réalisation des fiches projets.

A blue-tinted photograph of a hand, with a brain scan overlay on the right side. The hand is positioned as if holding something, with fingers slightly curled. The brain scan shows concentric rings, suggesting a cross-section of the brain.

# Maladie de Parkinson

<b>CereDySTim</b>	<b>p. 53</b>
<b>LOCOMOTIV</b>	<b>p. 54</b>
<b>MeMoDeeP</b>	<b>p. 55</b>
<b>MeTDePaDi</b>	<b>p. 56</b>
<b>NeuTARGETS</b>	<b>p. 57</b>
<b>OptoChAT-ParK</b>	<b>p. 58</b>
<b>OPTOMAP-Parkin</b>	<b>p. 59</b>
<b>STRIATRANS</b>	<b>p. 60</b>
<b>STRUCTOXIC</b>	<b>p. 61</b>
<b>TARGET PD</b>	<b>p. 62</b>
<b>X-PROTECT</b>	<b>p. 63</b>

# CereDySTim

## Stimulations du cervelet pour le traitement de la maladie de Parkinson et des dyskinésies

### — Rappel des objectifs

La maladie de Parkinson est l'un des principaux troubles neuro-dégénératifs avec une prévalence supérieure à 2 % après 65 ans. Cette maladie est causée par la dégénérescence d'une petite population des neurones entraînant la diminution d'un neurotransmetteur, la dopamine. Le traitement des patients avec un précurseur de la dopamine améliore considérablement certains des symptômes de la maladie, cependant des effets secondaires handicapants se développent et réduisent le bénéfice du traitement lorsque la neuro-dégénérescence progresse.

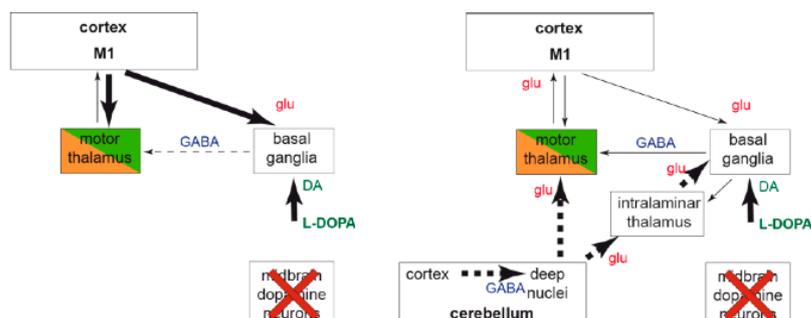
Notre projet s'est intéressé à la contribution du cervelet aux troubles moteurs dans la maladie de Parkinson et aux effets secondaires du traitement avec la lévodopa dans la phase tardive de la maladie. L'objectif de ce projet était d'examiner l'effet des stimulations du cervelet sur les effets secondaires des traitements pharmacologiques – genèse de mouvements involontaires handicapants – et sur la connectivité fonctionnelle des circuits moteurs du cerveau.

Le projet a fait appel à un spectre large de techniques de pointe pour la neurophysiologie chez l'animal éveillé : optogénétique, enregistrements multi-électrodes in vivo, analyse du comportement moteur. Il s'est également appuyé sur l'utilisation de modèles animaux de la maladie de Parkinson et de la dyskinésie ainsi que de souris transgéniques exprimant des canaux ioniques activés par la lumière dans les cellules de Purkinje dans le cervelet.

### — Résultats majeurs

Nous avons tout d'abord identifié le rôle du cervelet dans la coordination de l'activité neuronale corticale. Nous avons montré que le cervelet exerce principalement une action excitatrice sur cette activité corticale durant les tâches motrices ; son activité influence aussi la cohérence des oscillations corticales. Notre projet a identifié ensuite l'implication des cellules de Purkinje du cervelet et de relais thalamiques de la voie cérébello-corticale dans la maladie de Parkinson et dans le traitement des dyskinésies induites par la lévodopa. Nous avons montré une réduction de l'activité neurale dans le cortex moteur de modèles animaux de la maladie de Parkinson et une augmentation de l'activité du cortex moteur pendant l'état dyskinétique. Par des stimulations optogénétiques spécifiques des cellules de Purkinje sur une nouvelle lignée de souris transgéniques nous avons montré une suppression complète des dyskinésies oro-linguales après stimulations optogénétiques spécifiques de la zone oro-linguale du cervelet. Ces stimulations cérébelleuses ont été associées à une normalisation de l'activité du cortex moteur. Notre projet a donc révélé que le cervelet a un impact fonctionnel sur les mouvements involontaires handicapants et sur l'activité du cortex moteur.

Circuits moteurs dans la pathologie de Parkinson.  
Gauche : Modèle classique de l'impact de la dégénérescence des neurones dopaminergiques ; Droite : Modèle révisé : Nos résultats indiquent que le cervelet est un acteur de la normalisation du comportement moteur et aussi des voies cérébello-corticale et cérébello-striatale dans la maladie de Parkinson et dans les dyskinésies induites par la levodopa (DA : dopamine, L-DOPA : lévodopa, M1 : cortex moteur, glu : glutamate).  
Crédit : © Equipe Neurophysiologie des Circuits Cérébraux, IBENS, Paris.



### — Production scientifique et valorisation

L'ensemble de ce travail fait l'objet de plusieurs publications et présentations. Notre projet a donné lieu principalement à 4 publications (J Neurosci. 2013 et 2017, Nat Commun. 2018 et Cerebral Cortex 2019) et une thèse soutenue à l'Ecole Doctorale Comportement, Cerveau, Cognition en juin 2017 ainsi que de nombreuses présentations orales et affichées dans des colloques internationaux. Nous avons également organisé un colloque 'Cerebellum Day' en janvier 2017 où nous avons pu avoir des échanges entre nos recherches sur les modèles animaux et des recherches cliniques chez des patients Parkinsoniens. Ensemble, nous espérons pouvoir concevoir des thérapies d'appoint innovantes et peu coûteuses qui pourront améliorer l'état des patients Parkinsoniens en utilisant des stimulations répétées du cervelet induisant des changements durables dans les circuits moteurs du cerveau.

Publications :

- Menardy F, Varani A, Combes A, Léna C, Popa D. Functional alteration of the cerebellum-cortical coupling in experimental Parkinson's disease. *Cerebral Cortex* 2019 Apr 1;29(4):1752-1766.
- Tinterri A, Menardy F, Diana MA, Lokmane L, Keita M, Couplier F, Lemoine S, Mailhes C, Mathieu B, Merchan-Sala P, Campbell K, Gyory I, Grosschedl R, Popa D, Garel S. Active intermixing of indirect and direct neurons builds the striatal mosaic. *Nat Commun.* 2018 Nov 9;9(1):4725.
- Pelosi A, Menardy F, Popa D, Girault JA, Denis H. Heterozygous Gnal Mice Are a Novel Animal Model with Which to Study Dystonia Pathophysiology. *J Neurosci.* 2017, 37(26):6253-6267.
- Popa D, Spolidoro M, Proville R, Guyon N, Belliveau L, Léna C. Functional role of the cerebellum in gamma-band synchronization of the sensory and motor cortices. *Journal of Neuroscience,* 2013, 33(15):6552-6.

**Le projet CereDySTim est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a démarré en janvier 2013 et a duré 54 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR à hauteur de 293 280 €.**

#### COORDINATRICE

**Daniela Popa** : [daniela.popa@ens.fr](mailto:daniela.popa@ens.fr)  
Institut De Biologie de l'ENS, Neurophysiologie des Circuits Cérébraux  
<http://www.ibens.ens.fr/spip.php?rubrique53>

## LOCOMOTIV

## Losing Control of Motor Inhibition: a different View of parkinsonian akinesia

## — State of the art and scientific aims

The ability to inhibit behavior is increasingly recognized as a fundamental executive function, with dysfunctional inhibitory processes implicated in a growing number of neurological disorders. In motor control, response inhibition permits cancelling planned or initiated actions, but recent work in even this simple circumstance points to the existence of distinct types of response inhibition that can be confounded with each other as well as with ancillary cognitive processes. To date, intense controversy surrounds the interpretation of data from tasks eliciting response inhibition, due to difficulties in modeling the underlying psychological processes as well as recording associated neural network dynamics. Identifying the neural bases of response inhibition is a pressing clinical issue. While impulsivity is usually viewed as the unique outcome of disorders of response inhibition, excessive inhibitory control may actually lead to difficulty initiating actions. This is manifest in Parkinson's disease (PD), where akinesia is particularly disabling. Indeed, one of the most debilitating expressions of akinesia occurs during gait, where PD patients can experience « freezing of gait », where they are unable to initiate stepping, which can lead to falls with high mortality and morbidity. Our project is using specifically designed behavioral tasks performed by humans and non-human primates to characterize how neural activity within and across cortical and basal ganglia networks unfolds in time to support response inhibition in healthy individuals and Parkinson's disease patients with dysfunctional inhibitory control.

## — Main results

We have implemented parallel behavioral tasks to study response inhibition in healthy humans, PD patients and non-human primates. All these tasks have the common goal of isolating the effects of proactive and reactive inhibition, but with the possibility of using different response modalities (e.g., hand movements or gait initiation). We have successfully developed methods that allow us to record high-density electroencephalographic (EEG) activity while healthy subjects and PD patients use gait initiation to indicate their response. Moreover, we have successfully developed methods that allow us to do this when PD patients are undergoing DBS stimulation. Our principal results thus far are 1) high frequency STN-DBS degrades kinematic parameters of gait initiation, 2) high frequency STN-DBS decreases response inhibition resulting in more anticipatory movements, which is opposed by increased response inhibition on dopaminergic medication (but Off DBS), 3) neural processing of the stimulus modulates theta, alpha and beta band EEG activity in cortical areas in distinct ways, 4) we

have found evidence that neurons in the subthalamic nucleus are modulated by both proactive and reactive response inhibition, 5) dysfunction of the cortical control of inhibition in PD is not just a motor problem but involves abnormalities in executive networks. By identifying the clinically relevant electrophysiological signatures of inhibitory dysfunctions and STN-DBS effects, the new data obtained will hopefully contribute towards developing novel therapeutic interventions in PD, or improving currently suboptimal therapies, for instance by providing accurate targets for closed-loop approaches or direct cortical stimulation. The technology is ready and very promising, however, the clinical use of DBS is partly empirical, and awaits identification of accurate electrophysiological markers predicting clinically relevant outcomes.

## — Scientific outcomes

- ▶ Lio G, Thobois S, Ballanger B, Lau B, Boulinguez P. Removing deep brain stimulation artifacts from the electroencephalogram: Issues, recommendations and an open-source toolbox. *Clin Neurophysiol.* 2018 Oct;129(10):2170-2185.
- ▶ Opensource Toolbox: DBSFILT is a matlab toolbox designed to detect and remove deep brain stimulation induced artifacts from EEG or MEG data. <https://github.com/guillaumelio/DBSFILT>.
- ▶ Meyer GM, Spay C, Laurencin C, Ballanger B, Sescousse G, Boulinguez P. Functional imaging studies of Impulse Control Disorders in Parkinson's disease need a stronger neurocognitive footing. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019 Mar;98:164-176. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.01.008.
- ▶ Spay C, Albares M, Lio G, Thobois S, Broussolle E, Lau B, Ballanger B, Boulinguez P. Clonidine modulates the activity of the subthalamic-supplementary motor loop: evidence from a pharmacological study combining deep brain stimulation and electroencephalography recordings in Parkinsonian patients. *J Neurochem.* 2018 Aug;146(3):333-347.
- ▶ Spay C, Meyer G, Lio G, Pezzoli G, Ballanger B, Cilia R, Boulinguez P. Resting state oscillations suggest a motor component of Parkinson's Impulse Control Disorders. *Clin Neurophysiol.* 2019 Nov;130(11):2065-2075. doi: 10.1016/j.clinph.2019.08.015.
- ▶ Spay C, Meyer G, Welter ML, Lau B, Boulinguez P, Ballanger B. Functional imaging correlates of akinesia in Parkinson's disease: Still open issues. *NeuroImage: Clinical.* 2019;21:101644.
- ▶ Varriale P, Collomb-Clerc A, Van Hamme A, Perrochon A, Ke-moun G, Sorrentino G, George N, Lau B, Karachi C, Welter M-L. Decreasing subthalamic deep brain stimulation frequency reverses cognitive interference during gait initiation in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol.* 2018 129:2482-2491.

Le projet **LOCOMOTIV** est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2017 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 771 033,90 €.

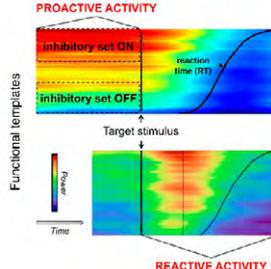
**Partenaires :** Inserm, UMRS 1127 / Institut du Cerveau et de la Moëlle épinière, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon.

**COORDINATEUR**

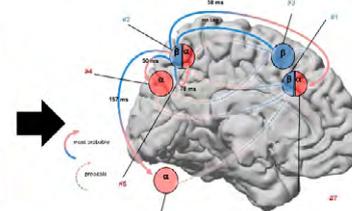
**Brian Lau :** [brian.lau@upmc.fr](mailto:brian.lau@upmc.fr)  
Inserm, UMRS 1127 / ICM

Data acquisition +  
Blind Source Separation

Crédit : © DR.

Spectral analyses (source level) +  
Statistical matching procedure

## Anato-functional modeling



Output: Network Dynamics Underlying inhibitory control in a Cortical Network Model

## MeMoDeeP

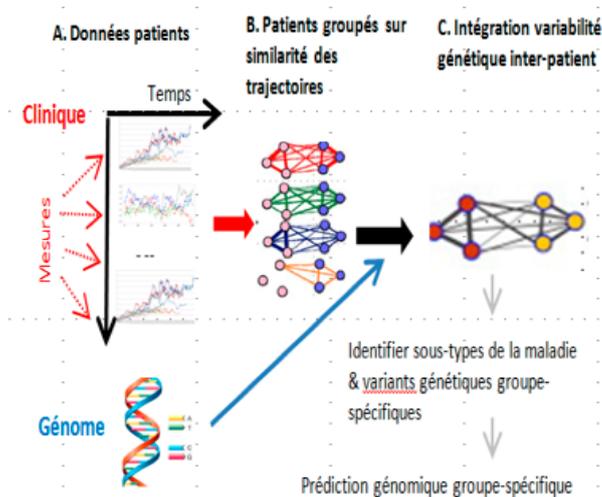
## Méthodes et Modèles pour la caractérisation phénotypique fine de la Maladie de Parkinson

## — Rappel des objectifs

La maladie de Parkinson (PD) est une maladie neurodégénérative liée à l'âge qui affecte 1 % de la population âgée de plus de 60 ans et 4 % au-delà de 80 ans. Plus de 100 000 personnes souffrent de cette maladie en France et le nombre de cas devrait augmenter considérablement avec le vieillissement de la population. À ce jour, les traitements ne sont que substitutifs et ne permettent pas d'empêcher la neurodégénérescence massive qui entraîne une perte progressive d'autonomie et finalement le décès. PD peut présenter différents sous-types cliniques et son évolution/gravité est très variable d'un patient à l'autre. Pour une pathologie complexe, comme PD, il n'existe pas de bio-marqueurs objectifs. L'intégration et la combinaison d'un grand nombre et aussi de différents types de variables est requise pour aller au-delà de la simple stratification empirique des patients. Toutefois, cette haute-dimensionnalité et ce mélange de types de données soulève des défis considérables. MeMoDeeP développe une étude exploratoire de différents modèles mathématiques et statistiques dans une grande cohorte longitudinale de PD (données temporelles – cliniques, d'évolution et traitement, et données pan-génomique). Les principaux objectifs sont d'évaluer les performances de ces méthodes pour identifier des sous-ensembles de patients où l'étiologie pourrait être plus homogène et pour lesquels la prévision génomique s'avérerait plus pertinente et précise.

## — Résultats majeurs

La cohorte DIG-PD (6 ans de suivi) contient ~500 variables longitudinales sur 415 patients ; soit ~1 915 observations par variable. Le génotypage haut-débit a été complété par des analyses d'imputations. Au total, la variabilité du génome de chaque patient est couverte par plus de 7 millions de SNPs, passant les filtres de contrôle qualité. MeMoDeeP a réalisé une analyse fine des structures de corrélations temporelles entre données hétérogènes des patients DIG-PD. Les résultats suggèrent une réduction possible de la dimension des données centrée autour d'une quinzaine de scores cliniques mesurant les performances motrices, non-motrices et cognitives des patients au cours du temps. Nos analyses se sont concentrées sur cet ensemble de scores ajustés pour des effets de genre et d'âge à la visite. MeMoDeeP a développé un modèle mathématique de clustering non supervisé original qui permet l'analyse temporelle jointe des scores. Ce modèle de mélange de régressions fait intervenir des poids logistiques fonction de variables génétiques ; celles qui pourraient ne pas être pertinentes pour la classification sont sélectionnées via une pénalité de type Lasso à la vraisemblance à maximiser. Nous avons validé la méthode d'inférence proposée sur des simulations. Moins de 2 milliers de SNPs peuvent être intégrés dans le modèle. Nos premières analyses se sont donc limitées à l'intégration de ~1800 SNPs fonctionnels (CADD score), présents dans les gènes exprimés dans le cerveau. Nous retrouvons des sous-types de PD et des variants génétiques ayant potentiellement un rôle dans cette typologie. Cependant, les valeurs de l'héritabilité génomique de ces premiers clusters se révèlent faibles (<5%) ne suggérant pas de mécanismes biologiques spécifiques à ces clusters. L'intégration de données génétiques tout-génome dans l'étape de clustering s'avère, comme nous l'avions suspecté, complexe d'un point de vue méthodologique. Nous avons donc étendu le travail méthodologique en développant une approche basée sur des analyses en composantes principales des données tout-



Modèles de classification non-supervisée basée sur des données cliniques longitudinales & Intégration de données pan-génomique pour démêtrer l'hétérogénéité étiologique de la maladie de Parkinson. Crédit : © M. Martinez.

génomique, qui intègre les principaux axes de variation en variables à effets fixes dans notre modèle de clustering. Une autre difficulté est la question de l'impact de l'effet sujet (observations temporelles non indépendantes) sur l'inférence statistique. Il peut donc s'avérer plus efficace et robuste d'ignorer la variabilité temporelle des scores cliniques mais d'intégrer les données tout-génome. Ces différentes alternatives sont en cours d'étude. Les comparaisons s'attachent à estimer et comparer l'héritabilité génomique intra-cluster obtenue par les différentes approches. Nos résultats seront soumis à réplification dans d'autres cohortes indépendantes (PPMI).

## — Production scientifique et valorisation

► MM Courbariaux, C Ambroise, ..., & the MeMoDeep Consortium. *A mixture model with logistic weights for disease subtyping with integrated genome association study*. *Statistics in Medicine* (soumis). Un package R a été développé (<https://github.com/MCour/DiSuGen>). Les méthodologies et premiers résultats ont été présentés sous forme de communication orale ou poster (Journées de Statistique, SFdS 2018) et séminaire (Inra Toulouse, 2019). Un manuscrit sera rédigé sur les résultats des analyses de validation des clusters via l'intégration de la variabilité génomique. Une journée de restitution finale, de type atelier de travail, est prévue pour l'été 2020 à l'ICEM, Paris.

**Le projet MeMoDeeP est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en février 2017 pour une durée de 42 mois (projet prolongé, fin prévue en mars 2021). Il a bénéficié d'une aide ANR de 388 360 €.**

**Partenaires :** CNRS UMR 8071, Inserm, UMR\_S1127 / Institut du cerveau et de la Moëlle Epinière.

**COORDINATRICE**

**Maria Martinez :** [maria.martinez@inserm.fr](mailto:maria.martinez@inserm.fr)  
IRSD Inserm U1220

## MeTDePaDi

## Défauts du trafic membranaire dans la maladie de Parkinson

## — Rappel des objectifs

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative progressive qui affecte plusieurs régions majeures du cerveau, en particulier la substance noire (SN). Bien que des traitements symptomatiques soient disponibles, il n'y a pas de traitement de protection ou curatif et le diagnostic n'est établi que lorsque la dégénérescence est avancée. Il existe donc un besoin médical majeur pour développer des traitements et identifier des biomarqueurs de MP à un stade précoce. À cet égard, la génétique a révélé l' $\alpha$ -synucléine, une protéine enrichie dans les corps de Lewy de cerveaux de MP et LRRK2, une protéine de signalisation, comme principaux facteurs pathologiques impliqués dans les MP familiales et sporadiques. Des données récentes suggèrent que l' $\alpha$ -synucléine, localisée dans les terminaisons nerveuses, régule la fonction de SNAREs à la base de la fusion membranaire responsable de la sécrétion. Récemment VAMP7 a été montré pour interagir avec LRRK1 et  $\alpha$ -synucléine pour se lier à VAMP2 et bloquer la sécrétion synaptique. Ces observations nous ont conduits à l'hypothèse de travail que l'exocytose dépendant des VAMP pourrait être régulée par LRRK2 et  $\alpha$ -synucléine et que ce mécanisme pourrait être défectueux dans la MP. Moduler la sécrétion dépendant de VAMP7 pourrait fournir une nouvelle cible prometteuse pour le traitement de patients parkinsoniens précocement diagnostiqués.

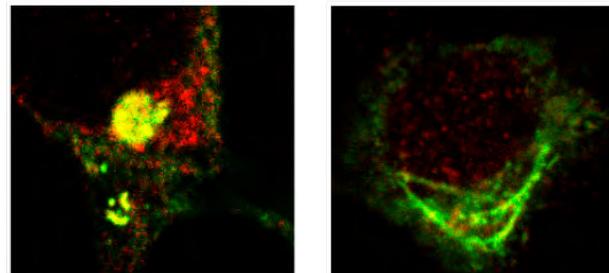
## — Résultats majeurs

1/ Nous avons testé l'interaction de LRRK2 avec VAMP2, 3, 4, 7, 8, Sec22b et YKT6. Nous avons constaté que l'interaction VAMP4 / LRRK2 était la plus forte et nous avons trouvé la hiérarchie d'interaction suivante : VAMP4 > VAMP7 > VAMP8. Les mutations pathogènes de LRRK2 G2019S et R1441C n'altèrent pas l'interaction avec VAMP4. VAMP4 localise dans les agrégats intracellulaires générés par ces formes mutées de LRRK2 (Figure 1). Nous explorons maintenant l'effet des mutations de LRRK2 sur le sécrétome de cellules neuronales. Nous avons mis en évidence le sécrétome dépendant de VAMP7 (Wojnacki et al, preprint 2019), et allons explorer celui dépendant de VAMP4. Notre hypothèse de travail est que les mutations pathogènes de LRRK2 pourraient affecter les voies de sécrétion dépendant de VAMP4 et VAMP7 (Figure 3).

2/ Nous avons testé l'effet de la modulation de la phosphorylation de LRRK2 sur son activité. Nous avons notamment pu observer que la phosphorylation de certains sites de LRRK2 pouvait altérer la phosphorylation de substrats de LRRK2 dans la cellule, tels que Rab8 et Rab10. Aussi, les liens entre LRRK2, VAMP7 et  $\alpha$ -synucléine ont été analysés avec une proximité physique entre ces 3 protéines observées par proximity ligation assay (PLA) en cellules HEK293T (Figure 2). Nous observons aussi que les niveaux d' $\alpha$ -synucléine sont influencés par la surexpression de LRRK2 et VAMP7, suggérant une coopération de LRRK2 et VAMP7 pour réguler les niveaux cellulaires d' $\alpha$ -synucléine.

## — Production scientifique et valorisation

► Wojnacki J, Pressé M, Nola S, Cholley B, Delevoye C, Ouslimani A, Lipecka J, Guerrero C, Bun P, Fader C, Colombo MI and Galli T. VAMP7-Dependent Autophagic Secretion Allows for Axonal Growth in Nutrient Restriction Conditions (July 1, 2019). DEVELOPMENTAL-CELL-D-19-00530. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3413101> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3413101>, article in revision.



À gauche : GFP-LRRK2<sup>G2019S</sup> (vert), VAMP4 (rouge). À droite : GFP-LRRK2<sup>R1441C</sup> (vert), VAMP4 endogène (rouge).  
Figure 1 : VAMP4 qui se situe normalement dans le TGN et des vésicules endosomales apparaît piégé dans les agrégats de LRRK2 lors de l'expression de mutants pathogènes (Francesca Filippini, Thierry Galli).

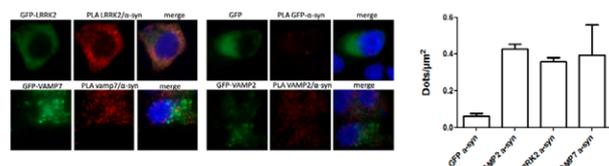


Figure 2 : Proximité physique entre  $\alpha$ -syn/LRRK2,  $\alpha$ -syn/VAMP7 et  $\alpha$ -syn/VAMP2 visualisé par 'proximity ligation assay' PLA. Des cellules HEK293T sont transfectées avec les plasmides flag- $\alpha$ -syn/GFP-VAMP7, flag- $\alpha$ -syn/GFP-VAMP2 et flag- $\alpha$ -syn/GFP-LRRK2 avec flag- $\alpha$ -syn/GFP comme contrôle négatif. Le marquage est effectué avec les anticorps anti-flag et anti-GFP. Dans le panneau de droite, sont données les quantifications de co-localisation des points rouges avec le GFP effectuées dans le logiciel Fiji sur 10 cellules par échantillon (Alessia Sarchione, Antoine Marchand, Jean-Marc Taymans, Marie-Christine Chartier-Harlin).

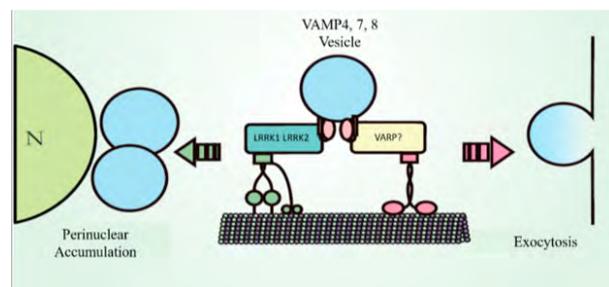


Figure 3 : modifié d'après Wang *et al.*, iScience 2018.  
Hypothèse de travail : LRRK2 et LRRK1 seraient impliqués dans le transport des vésicules endosomales. Les mutations LRRK2 empêcheraient l'exocytose des vésicules VAMP4 et VAMP7.

Le projet MeTDePaDi est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en février 2017 pour une durée de 48 mois (projet prolongé, fin prévue en juillet 2021). Il a bénéficié d'une aide ANR de 639 000 €.

Partenaires : JPArc / INSERM U1172 (LNC).

## COORDINATEUR

Thierry Galli : [thierry.galli@inserm.fr](mailto:thierry.galli@inserm.fr)

INSERM U1266 (IPNP)

<https://ipnp.paris5.inserm.fr/recherche/equipes-et-projets/15-equipe-galli>

# NeuTARGETS

## Targeting the propagation of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative disease

### — Rappel des objectifs

Les données actuelles appuient l'hypothèse que la progression des maladies neurodégénératives (MND) peut être causée par la propagation des agrégats d'une cellule à l'autre. Nous cherchons à élucider les mécanismes clés de la façon dont les protéines se replient en assemblages toxiques et se transfèrent entre les neurones et le long des voies neuronales, facilitant ainsi la propagation des MND. Nous étudions ces mécanismes en utilisant une approche à plusieurs niveaux, des molécules aux modèles animaux, et combinons des techniques structurales et biophysiques et la biologie cellulaire. Nous visons à développer de nouvelles cibles thérapeutiques pour arrêter l'autoréplication et la propagation des agrégats d'amyloïde-bêta (A $\beta$ ) et d'alpha-synucléine ( $\alpha$ S) afin d'améliorer la progression de la maladie d'Alzheimer's (AD) et de Parkinson's (PD).

Le projet est organisé en deux grands axes :

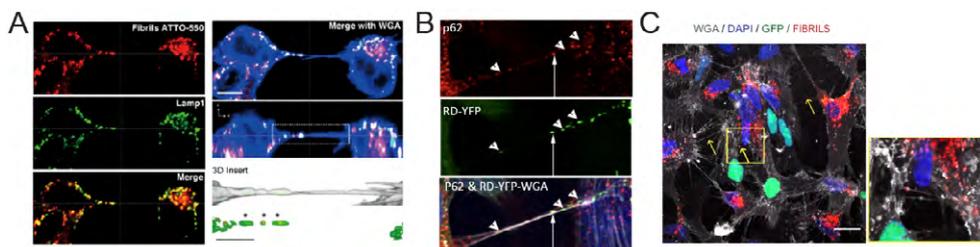
**AXE 1 :** Perturbation de la propagation et de la dissémination d'assemblages de protéines pathogènes : 1a. analyse du processus d'agrégation, de l'ensemencement et de la toxicité cellulaire de  $\alpha$ S et A $\beta$ . 1b. Suivi de leur trafic et leur transfert vers les cellules réceptrices et identification des voies communes. 1c. Identification de cibles thérapeutiques communes par criblage à haut débit des facteurs cellulaires impliqués dans la toxicité, le trafic et l'agrégation de  $\alpha$ S et A $\beta$ .

**AXE 2 :** Inactivation des assemblages de protéines pathogènes aux stades précoces et asymptomatiques de la maladie. Production d'outils thérapeutiques (peptides dérivés du chaperon, anticorps) qui interféreraient avec  $\alpha$ S et A $\beta$ , la nucléation, la propagation, la stabilité et pour réduire leur toxicité.

### — Résultats majeurs

En utilisant des approches interdisciplinaires allant de la biologie cellulaire à la biophysique nous avons obtenu des données sur les propriétés structurales et fonctionnelles des agrégats protéiques pathologiques, leur toxicité et leurs mécanismes de propagation et d'ensemencement qui sont essentielles pour identifier des cibles pour de futurs traitements. Nous avons également révélé des voies communes que les agrégats utilisent pour se propager ; ce qui laisse croire que les cibles thérapeutiques pour la MA et la MP pourraient être applicables à d'autres MND.

► **Partenaire 1 :** A démontré l'implication des « tunneling nanotubes » dans le transfert et la propagation des agrégats  $\alpha$ S dans les lysosomes (Figure 1) ainsi que dans le transfert  $\alpha$ S entre les neurones primaires et les astrocytes et a identifié les protéines/complexes qui sont impliqués dans la formation des nanotubes (Figure 2).



**Figure 1.** Les protéines mal repliées se répandent à l'intérieur des TNT. A) Les fibrilles syn à l'intérieur des TNT entre cellules CAD colocalisent avec le marqueur lysosomal Lamp1. B) Fibrilles de Tau à l'intérieur des TNT entre les cellules SH5Y5 neuronales colocalisent avec le marqueur autophagique P62. C) Fibrilles syn à l'intérieur des TNT entre les hULP. Crédit : © DR.

► **Partenaire 2 :** A produit et analysé des propriétés structurales et fonctionnelles de différentes souches de  $\alpha$ S, découvert des « cross-talk » entre les fibrilles pathogènes  $\alpha$ S et tau au niveau des membranes cellulaires neuronales, en particulier les synapses. Ils ont mis en place une méthode permettant l'amplification des dépôts de protéines riches en  $\alpha$ S du cerveau des patients pour des études complémentaires.

► **Partenaire 3 :** A établi un modèle organotypique de culture en tranches de  $\beta$ -amyloïdosis et a caractérisé l'utilisation d'anticorps pour traiter les protéines endogènes chez les souris transgéniques APP.

► **Partenaire 4 :** A conduit une étude ultrastructurale des intermédiaires lors de la formation de fibrilles A $\beta$  et introduit une stratégie d'utilisation d'anticorps pour cibler spécifiquement la nucléation secondaire dépendant des fibrilles.

### — Production scientifique et valorisation

- Abounit S *et al.*, EMBO J. 35, 2120-2138, 2016.
- Loria F *et al.*, Acta Neuropathol. 134(5):789-808, 2017.
- Shrivastava AN *et al.*, Neuron. 5;95(1):33-50, 2017.
- Shrivastava AN *et al.*, EMBO J. doi : 10.15252/embj.201899871, 2019.
- Novotny R. *et al.*, J Neurosci. 36 : 5084-5093, 2016.
- Jucker M, Walker LC, Nat Neurosci, 21:1341-1349 ; 2018.
- Meisl G *et al.*, Chem Sci, 8(6):4352-4362, 2017.
- Munke A. *et al.*, PNAS, 114(25):6444-6449, 2017.

**Le projet NeuTARGETS est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en décembre 2014 et a duré 53 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 556 643 €.**

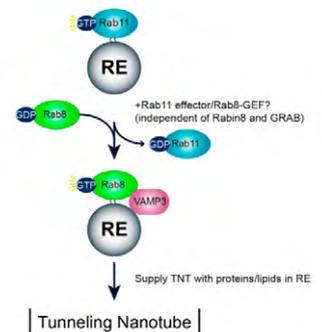
**Partenaires :** CNRS NEURO-PSI - UMR 9197, HIH & DZNE Tübingen (Allemagne), Lund University (Suède).

#### COORDINATRICE

**Chiara Zurzolo :** chiara.zurzolo@pasteur.fr

Institut Pasteur

<https://research.pasteur.fr/fr/team/membrane-traffic-and-pathogenesis/>



**Figure 2.** Schéma de la cascade Rab11a-Rab8a-VAMP3 dans la régulation des TNT. Deux protéines Rab (Rab11, Rab8) découvertes par l'analyse à haut débit de 41 protéines Rab, contrôlent positivement la formation de TNT par un mécanisme de cascade. Crédit : © DR.

## OptoChAT-Park

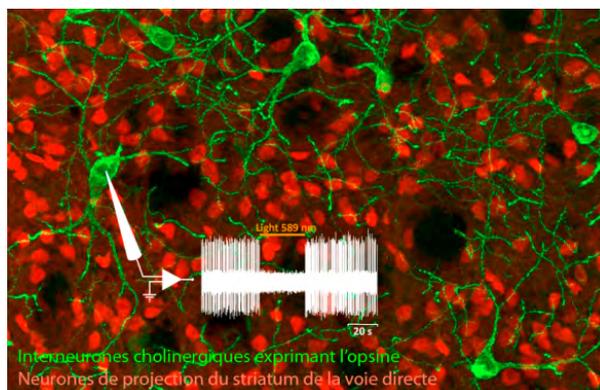
# Plasticité et rôle des microcircuits striataux impliquant les interneurons cholinergiques dans le fonctionnement physiopathologique des ganglions de la base

### — Rappel des objectifs

L'un des enjeux de la neurobiologie est de pouvoir disséquer le rôle fonctionnel de populations neuronales spécifiques au sein de réseaux neuronaux complexes. Cette connaissance pourrait notamment contribuer à affiner le ciblage des approches thérapeutiques de neuromodulation, du niveau des structures cérébrales à celui de leurs éléments constitutifs. Le développement de l'optogénétique constitue une avancée technologique essentielle dans ce domaine. Cette approche permet en effet, au travers de l'expression génétiquement ciblée de protéines photosensibles, de contrôler par la lumière l'activité neuronale avec une grande précision spatiotemporelle. Le projet OptoChAT-Park s'est focalisé sur les interneurons cholinergiques (CINs) du striatum, structure d'entrée des ganglions de la base, en condition physiologique et dans des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson, chez la souris. Bien qu'en faible nombre (< 2 % des neurones du striatum), les CINs, de par leur activité tonique et leur connectivité, sont présumés représenter des acteurs clés des fonctions et pathologies associées aux ganglions de la base, dont la maladie de Parkinson. Cependant, la complexité de leurs mécanismes de signalisation et la multiplicité de leurs cibles rendent difficile l'évaluation de leur impact sur le fonctionnement normal et pathologique des ganglions de la base et les comportements qui en dépendent.

### — Résultats majeurs

En associant approches optogénétique, électrophysiologique et comportementale, le projet OptoChAT-Park a apporté une démonstration directe de l'implication des CINs dans la pathophysiologie des troubles moteurs parkinsoniens (Maurice *et al.*, Cell Rep. 2015). Le contrôle exercé par les CINs sur la fonction motrice se manifeste en condition parkinsonienne, où ils deviennent hyperexcitables, et non en situation physiologique, suggérant que ce contrôle dépend fortement du tonus dopaminergique. La photo-inhibition des CINs réduit les déficits parkinsoniens dans différents tests sensorimoteurs, alors que leur photo-activation n'a pas d'effet, corrige les modifications pathologiques de l'activité de la structure de sortie des ganglions de la base et restaure un équilibre dans le transfert des informations corticales au travers du réseau. Cet effet s'exercerait préférentiellement au travers d'une action sur la voie directe par laquelle le striatum contrôle l'activité de la structure de sortie. Les autres résultats marquants montrent qu'en condition parkinsonienne : i) le blocage des récepteurs muscariniques M1 ou M4 reproduit les effets bénéfiques moteurs obtenus après photo-inhibition des CINs, avec une action prépondérante des M4 exprimés sur les neurones de la voie directe (Ztaou *et al.*, 2016) ; ii) l'inhibition des CINs a également des effets bénéfiques sur des déficits non moteurs (Ztaou *et al.*, 2018), améliore l'apprentissage sensorimoteur et augmente la transmission corticostriée spécifiquement dans les neurones de la voie directe. L'ensemble de ce travail a montré la faisabilité et l'efficacité du contrôle optogénétique d'une petite population neuronale au sein d'une large structure cérébrale chez la souris. Il a mis en évidence un rôle causal des CINs dans la pathophysiologie de la maladie de Parkinson permettant d'impliquer ces interneurons dans les effets bénéfiques des stratégies anti-cholinergiques et apporté un éclairage sur les substrats cellulaires de leur action. Ces évidences précliniques du potentiel thérapeutique de l'inhibition des CINs pourraient promouvoir la recherche de stratégies ciblant l'activité de ces neurones, au-delà de la manipulation de leurs récepteurs.



Double visualisation, dans le striatum de souris transgéniques, des neurones de projection de la voie directe (fluorescence rouge) et des interneurons cholinergiques dans lesquels a été exprimée l'halorhodopsine permettant leur photo-inhibition (fluorescence verte). Le tracé électrophysiologique illustre l'arrêt de l'activité spontanée d'un interneurone cholinergique lorsque de la lumière ambre est délivrée *in vivo* dans le striatum de ces souris. Crédit : © Nicolas Maurice & Florence Jaouen.



Tests comportementaux évaluant les perturbations sensorimotrices dans des modèles murins de la maladie de Parkinson. Les souris ne peuvent descendre du poteau test (gauche ; © Noémie Roché) ni se désengager d'une posture inhabituelle (catalepsie induite par un neuroleptique (droite) ; © Samira Ztaou). Ces déficits sont réduits par la photo-inhibition des CINs.

### — Production scientifique et valorisation

Publications :

- ▶ Maurice N *et al.* Cell Rep. 2015;13:657-66.
- ▶ Ztaou S *et al.* J Neurosci, 2016;36:9161-72.
- ▶ Ztaou S, Lhost J, Watabe I, Torromino G, Amalric M. Eur J Neurosci. 2018;48:2988-3004.
- ▶ Ztaou S, Amalric M. Neurochem Int. 2019 ;126:1-10. Review.
- ▶ Mallet, N., Leblois, A., Maurice, N., & Beurrier, C. (2019). Striatal Cholinergic Interneurons: How to Elucidate Their Function in Health and Disease. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1488. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01488>.

**Le projet OptoChAT-Park est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en février 2011 et a duré 41 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 386 918 €.**

**Partenaires :** CNRS UMR 6155 LNC / Aix-Marseille Univ.

#### COORDINATRICE

**Lydia Kerkerian-Le Goff :**  
lydia.kerkerian-le-goff@univ-amu.fr  
CNRS UMR 6216 / Aix-Marseille Univ.  
<http://www.ibdm.univ-mrs.fr/>

## OPTOMAP-Parkin

## Electrophysiological mapping of networks dynamics in basal ganglia in normal and Parkinsonian conditions using optogenetic control of specific neuronal pathway

## — State of the art and scientific aims

Normal brain functions rely on the overall modulation of cell firing activity and the precise spatiotemporal control of firing pattern, including (possibly synchronized) oscillatory activity among neuronal network and brain areas. Disruption in the dynamical properties orchestrating local firing rates and global network oscillations changes are observed in many neurological disorders. This is particularly well-illustrated in the basal ganglia where the loss of dopamine in Parkinson's disease is associated with persistent alterations in both the firing rate and oscillatory synchronization in the beta ( $\beta$ ) frequency range (12-30 Hz) among and between basal ganglia nuclei. These two activity changes (i.e. firing rate and  $\beta$ -synchronization) have been proposed to underlie the main motor symptoms of PD that are akinesia and rigidity. Understanding which neuronal circuits orchestrate and propagate these abnormal activities is a necessary step to better control them for symptomatic benefit. The goal of this work was therefore to shed light on the mechanistic principle underlying the generation of these parkinsonian abnormal neural dynamics. To do so, we employed optogenetic methods that relied on the use of modified adeno-associated virus (AAV) to express light-sensitive protein (i.e. opsins) into neurons of interest in order to control them directly with light stimulation. One great advantage of such optogenetic strategy is to be able to manipulate targeted neuronal populations with unprecedented specificity and millisecond temporal control. We have used different opsins depending on the desired effect: neuronal inhibition to test the necessity condition, and neuronal excitation to test for the sufficiency condition. Using this optogenetic approach we were able to test different hypothesis regarding the specific contribution of various neuronal circuit components such as the motor cortex, the subthalamic nucleus, and the globus pallidus to the pathophysiology of Parkinson's disease in a rat model.

## — Main results

A longstanding controversy has been to understand how these different components of the cortico-basal ganglia circuits contribute to the generation of abnormal neural activities underlying

Parkinsonism. Our results cast doubt on the capacity of the motor cortex or the subthalamic neurons to generate, propagate or amplify abnormally synchronous oscillatory activity at  $\beta$ -frequency in Parkinsonism thus challenging current dogma in the field. On the opposite, we were able to reveal a novel key role of the globus pallidus in the circuit dysfunction of Parkinson's disease which was not identified previously. In particular, our results place the globus pallidus as a central hub nucleus in basal ganglia circuits not only capable of orchestrating abnormal firing rate and synchronization changes but also broadcasting them to the entire cortico-basal ganglia network. This work might help designing new therapeutic avenues to better control the abnormal activities present in Parkinsonism with the goal to improve symptomatic benefit.

## — Scientific outcomes

- ▶ de la Crompe, B., Aristieta, A., Leblois, A., Elsherbiny, S., Boraud, T., and Mallet, N. (2020). The globus pallidus orchestrates abnormal network dynamics in Parkinsonism. *Nat Commun* 11, 1570 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15352-3>.
- ▶ Mallet N., Delgado L., Chazalon M., Miguelez C., Baufreton J. (2019) Cellular and Synaptic Dysfunctions in Parkinson's Disease: Stepping out of the Striatum. *Cells* 29;8(9).
- ▶ Mallet, N., Schmidt, R., Leventhal, D., Chen, F., Amer, N., Boraud, T., and Berke, J.D. (2016). Arky pallidal Cells Send a Stop Signal to Striatum. *Neuron* 89, 308–316.

Le projet OPTOMAP-Parkin est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2014 et a duré 45 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 324 168 €.

## COORDINATEUR

Nicolas Mallet : [nicolas.mallet@u-bordeaux.fr](mailto:nicolas.mallet@u-bordeaux.fr)  
CNRS UMR 5293 / Université de Bordeaux  
<https://www.bordeaux-neurocampus.fr/staff/nicolas-mallet/>

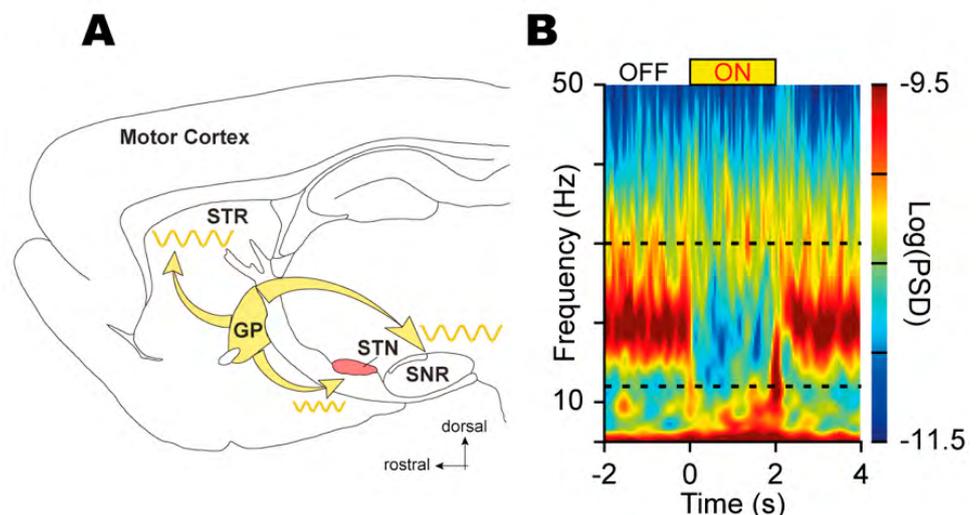


Figure 1 : A, Schematic representation illustrating the hub function of globus pallidus (GP) neurons to orchestrate and propagate abnormal  $\beta$ -synchronization within basal ganglia circuits. B, Optogenetic inhibition of globus pallidus neurons suppresses the abnormal expression of 20 Hz  $\beta$ -oscillations in the cortex.  
Figure de la publication de la Crompe *et al.*, The globus pallidus orchestrates abnormal network dynamics in a model of Parkinsonism. *Nature Communications* 11, 1570 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15352-3>

# STRIATRANS

## Mécanismes moléculaires impliqués dans la synthèse locale de protéines dans le striatum : de l'apprentissage contrôlé par la récompense à la pathologie

### — Rappel des objectifs

La sélection et l'exécution d'une réponse comportementale adéquate reposent sur l'utilisation d'informations (stimuli sensoriels et/ou contextuels) prédictives d'évènements motivationnels positifs ou aversifs. Les mécanismes d'apprentissage contrôlé par la récompense conduisant à l'optimisation de ces comportements motivés requièrent l'intégrité de la transmission dopaminergique (DA). La survenue de stimuli sensoriels associés à l'obtention d'une récompense inattendue (dite récompense primaire) provoque l'activation de certains neurones DA. Cette activation est modifiée au fil de l'apprentissage, puisqu'elle survient ensuite en réponse aux stimuli prédictifs de la récompense primaire, et non plus à la récompense primaire elle-même. De plus, ces neurones DA codent pour les erreurs de prédiction de récompense, un aspect essentiel de la mise en place d'apprentissage de comportements motivés. Ces neurones sont également inhibés par la présentation de stimuli aversifs inattendus, et codent ainsi plus généralement la valeur de la motivation. D'autres neurones DA vont au contraire être activés par des stimuli aversifs et/ou des signaux d'alerte impliqués dans la détection rapide d'évènements sensoriels potentiellement importants. L'identification de ces différentes populations de neurones DA illustre ainsi la complexité et la diversité des mécanismes neuronaux par lesquels la DA participe à l'apprentissage et au contrôle d'actions motivées. Une perturbation de la transmission DA entraîne des dysfonctionnements des circuits neuronaux qu'elle contrôle conduisant au développement d'états pathologiques (maladie de Parkinson, troubles obsessionnels compulsifs (TOC) ou encore troubles anxieux généralisés). Dans ce contexte, l'objectif de STRIATRANS est de disséquer les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlés par la DA et à en déterminer le rôle fonctionnel au sein de circuits neuronaux identifiés dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. Ce projet s'est focalisé sur l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la traduction des protéines au sein d'une structure cible des neurones DA, le striatum.

### — Résultats majeurs

En combinant des approches comportementales, anatomo-fonctionnelles et pharmacologiques, nous avons pu démontrer que l'administration de psychostimulants augmente 1) l'activation de facteurs contrôlant l'initiation et l'élongation de la traduction des ARNm et 2) la phosphorylation de la protéine ribosomale rpS6, spécifiquement dans les neurones striatonigraux (qui expriment les récepteurs DA D1R) via une cascade AMPc/PKA/DARPP-32. Ces événements moléculaires sont importants pour la mise en place des effets comportementaux à long-terme induits par les psychostimulants. En recherchant les conséquences fonctionnelles de cet événement de phosphorylation, nous avons pu montrer que l'absence de phosphorylation de rpS6 n'altérait pas la traduction globale des ARNm mais affectait uniquement un sous-ensemble d'ARNm dont nombre d'entre eux codent pour des protéines associées à la fonction des mitochondries. Ainsi une des fonctions de la phosphorylation de rpS6 dans le striatum est de contrôler la synthèse rapide d'ARNm codant pour des protéines mitochondriales afin de maintenir de l'homéostasie énergétique des cellules. L'absence de phosphorylation de rpS6 s'accompagne d'une altération de la plasticité synaptique striatale.

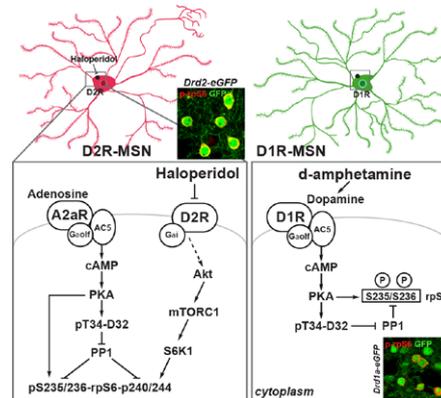


Schéma présentant les mécanismes intracellulaires conduisant à la phosphorylation de la sous-unité ribosomale S6 (rpS6) en réponse à l'administration d'halopéridol et d'amphétamine dans les neurones striataux exprimant les récepteurs D2R et D1R. Schéma adapté de Valjent E, Biever A, Gangarossa G, Puighermanal E. Adv Protein.

Nous avons pu également montrer que l'administration aiguë d'un antipsychotique, l'halopéridol, induit la phosphorylation rapide et soutenue de la sous-unité ribosomale S6 (rpS6) (Ser235/236 et Ser240/244) exclusivement dans les D2-MSNs. Cette régulation met en jeu la stimulation des récepteurs à l'adénosine A2a (A2aR), la production d'AMPc et fait intervenir l'inhibition de la PP-1 par la DARPP-32. Seule la phosphorylation de rpS6 sur les résidus Ser240/244 requiert l'activation de la voie mTORC1. Cette étude a permis de préciser les mécanismes moléculaires d'action de l'halopéridol qui pourraient sous-tendre la mise en place des dyskinésies tardives fréquemment observées lors de la prise répétée d'halopéridol.

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Biever A, *et al.*, J Neurosci. 2015, 35(10):4113-30. [Cover Illustration].
- ▶ Valjent E, *et al.*, Neuropsychopharmacology 2011, 36(12):2561-70.
- ▶ Bonito-Oliva A, *et al.*, Neuropharmacology. 2013, 72:197-203.
- ▶ Puighermanal E, *et al.*, Front Mol Neurosci. 2017, 10:419.
- ▶ Biever A, *et al.*, Front Mol Neurosci. 2017, 9:165.
- ▶ Biever A, Valjent E, Puighermanal. Front Mol Neurosci. 2015, 8:75. Review.
- ▶ Gangarossa G, Perroy J., Valjent E. Brain Struct Funct. 2013 218(2):405-19.

**Le projet STRIATRANS** est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mars 2011 et a duré 45 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 240 000 €.

#### COORDINATEUR

**Emmanuel Valjent** : emmanuel.valjent@igf.cnrs.fr  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
<https://www.igf.cnrs.fr/index.php/fr/h-teams-fr/h-valjent-fr>

# STRUCTOIXIC

## Relation structure-propriétés des agrégats protéiques impliqués dans les maladies neurodégénératives de Parkinson et Huntington

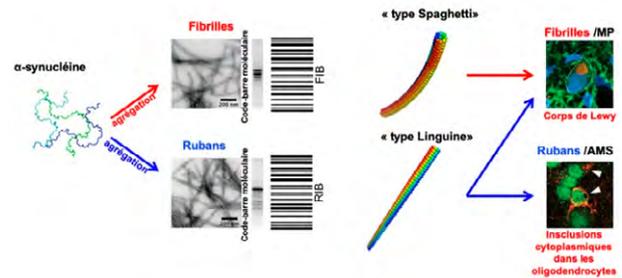
### — Rappel des objectifs

Les maladies neurodégénératives d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington sont intimement associées à l'agrégation hautement ordonnée de protéines endogènes. Des observations faites par Heiko Braak, Patrik Brundin et Jeffrey Kordower suggèrent que les agrégats des protéines caractéristiques de ces maladies neurodégénératives se propagent et s'amplifient dans le système nerveux central de patients affectés à la manière de la protéine infectieuse PrP. Nous avons montré que les assemblages des protéines huntingtine et alpha-synucléine qui sont impliqués dans les maladies neurodégénératives de Huntington et de Parkinson se lient aux cellules et induisent l'agrégation de leurs homologues endogène. Nous avons proposé que ce phénomène contribue à la progression de ces maladies neurodégénératives. En effet, à la mort des neurones, les agrégats des protéines huntingtine et alpha-synucléine qui se sont formés et accumulés dans les neurones affectés, sont libérés. Ils peuvent alors se lier aux membranes des neurones avoisinants, y pénétrer et servir d'amorces pour l'agrégation des protéines des cellules saines, entraînant de proche en proche la dégénérescence des neurones dans le cerveau.

### — Résultats majeurs

Nous avons identifié et caractérisé la structure des assemblages protéiques qui ont la propriété de pénétrer dans les cellules et d'induire l'agrégation des protéines des cellules saines. Nous avons identifié leurs cibles à la surface des neurones et des astrocytes. Cela nous a permis de décrire les premiers événements pathogéniques qui affectent l'intégrité neuronale : la redistribution pathogénique de protéines essentielles à la surface des neurones. Nous avons aussi montré que ces agrégats sont transportés le long de l'axone et transmis d'un neurone à un autre. Comme ces agrégats protéiques se retrouvent « nus » lors de leur transit entre neurones, nous avons cherché à les cibler. Nous avons montré que le chaperon moléculaire Hsc70 se lie à ces agrégats et affecte leur propagation entre cellules. Comme cette découverte présente un potentiel thérapeutique, nous avons cartographié les aires d'interaction entre les agrégats des protéines alpha-synucléine et huntingtine et le chaperon moléculaire Hsc70.

La propagation des assemblages de la protéine alpha-synucléine de neurone à neurone dans le système nerveux central contribue à la progression de pathologies regroupées sous l'appellation synucléinopathies: la maladie de Parkinson, l'atrophie multisystématisée et la démence à corps de Lewy. Cela suggère qu'un même événement moléculaire peut causer différentes maladies. Nous avons émis l'hypothèse que des synucléinopathies distinctes par leurs profils clinico-pathologiques auraient une base moléculaire et structurale. Nous avons réussi à générer dans un tube à essais différentes formes fibrillaires à partir de l'alpha-synucléine. Nous avons documenté les propriétés biochimiques, physiques, structurales et fonctionnelles de ces différentes formes fibrillaires, l'une ressemblant dans un microscope électronique à des pâtes larges (linguine), l'autre à des pâtes cylindriques pleines (spaghetti) et avons montré qu'elles entraînaient l'apparition des caractéristiques pathologiques des maladies de Parkinson ou de l'atrophie multisystématisée. Nous avons ainsi établi une base moléculaire et structurale pour différentes synucléinopathies.



L'alpha-synucléine s'agrège en différentes sortes de fibres qui ont des formes différentes (fibrilles ou rubans) et des code-barres distincts. Ces agrégats induisent les caractéristiques de pathologies distinctes Maladie de Parkinson ou Atrophie MultiSystématisée lors de leur injection à des animaux modèle. Crédit : © Ronald Melki, Luc Bousset, Wouter Peelaerts.

### — Production scientifique et valorisation

Nos travaux ont donné lieu à 27 publications. Les 5 principales :

- ▶ Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, Madiona K, Olieric V, Böckmann A, Meier BH, Melki R. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun.* 2013; 4:2575. doi: 10.1038/ncomms3575.



- ▶ Monsellier E, Redeker V, Ruiz-Arlandis G, Bousset L, Melki R. Molecular interaction between the chaperone Hsc70 and the N-terminal flank of huntingtin exon 1 modulates aggregation. *J Biol Chem.* 2015; 290:2560-76. doi: 10.1074/jbc.M114.603332.
- ▶ Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R\*, Baekelandt V. Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after administration *Nature* 2015; 522:340-4. doi: 10.1038/nature14547. Recommended F1000, Highly Cited Paper, News and views in Nature\* auteur correspondant.
- ▶ Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, Liebmann T, Bousset L, Renner M, Léna C, Aperia A, Melki R\*, Triller A alpha-synuclein assemblies sequester neuronal proteins and impair their function *EMBO J.* 2015. 34:2408-23. doi: 10.15252/embj.201591397. Cover issue, News and views in *EMBO J\** auteur correspondant.
- ▶ Brahic M, Bousset L, Bieri G, Melki R, Gitler AD. Axonal transport and secretion of fibrillar forms of alpha-synuclein, Aβ42 peptide and HTTexon 1. *Acta Neuropathol.* (2016) 131:539-48. doi: 10.1007/s00401-016-1538-0.

Le projet **STRUCTOIXIC** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2012 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 300 000 €.

Partenaires : CNRS Lyon et Beat Meier, ETH Zurich.

#### COORDINATEUR

Ronald Melki : ronald.melki@cnrs.fr  
CNRS, Institut François Jacob (MIRCent)

## TARGET PD

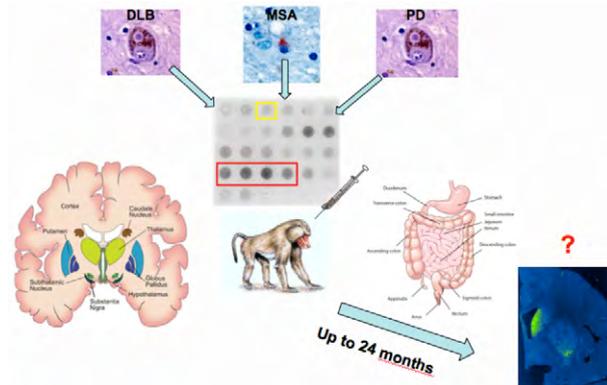
## Modélisation multi-factorielle de la dégénérescence parkinsonienne : vers des modèles translationnels heuristiques

## — Rappel des objectifs

En dépit des progrès sans précédent dans la compréhension des mécanismes neurodégénératifs dans la maladie de Parkinson (MP), AUCUN modèle mammifère ne reproduit encore la dégénérescence parkinsonienne âge-dépendante, la pathologie  $\alpha$ -synucléine avec ses inclusions, la physiopathologie de la MP ainsi que la large gamme de symptômes parkinsoniens moteurs et non moteurs. Cette absence empêche le développement de stratégies thérapeutiques neuroprotectrices et neurorégénératives, et constitue un obstacle tant pour la recherche académique qu'industrielle dans la nécessaire translatabilité des découvertes fondamentales en données cliniquement pertinentes. Les données épidémiologiques et cliniques suggèrent fortement que la MP résulte d'une étiologie multifactorielle impliquant des facteurs de susceptibilité génétique et d'expositions environnementales se superposant au vieillissement, le facteur de risque majeur de la MP. La nature multifactorielle des causes dégénératives et des processus a été négligée jusqu'à présent, expliquant l'échec de la réplique de la MP chez les mammifères. Nous proposons ici quatre catégories de mécanismes que nous avons combiné dans un cadre intégré: (i) le rôle du vieillissement, (ii) le rôle de la dysfonction lysosomale (s), (iii) le rôle de l' $\alpha$ -synucléine agissant potentiellement à la manière d'un prion et, d'une importance primordiale, (iv) la plus grande susceptibilité des neurones dopaminergiques de primates par rapport aux neurones dopaminergiques des rongeurs PD.

## — Résultats majeurs

TARGET PD a donc modélisé de façon innovante la MP chez la souris et les primates l'interaction de ces causes de la mort cellulaire dans la MP. Que TARGET PD soit un programme ambitieux promoteur d'un potentiel de rupture épistémologique qui augmente la compétitivité de la France tout en ouvrant la voie vers des modèles de validation préclinique des traitements neuroprotecteurs pour la MP et au-delà, justifiait d'accepter le défi qu'il représentait. Nous avons répondu à l'ensemble des objectifs en déterminant que le vieillissement est un facteur qui s'ajoute aux mécanismes propres à la MP mais qui de fait n'est pas un facteur de risque, tant chez les rongeurs que chez les primates. Nous avons caractérisé les dysfonctions lysosomales dans de nombreux modèles et apportés des pistes encourageantes sur la modulation de la voie autophagique-lysosomale en tant que poste thérapeutique pour ces pathologies à accumulation de protéines. Nous avons mené l'effort sans précédent d'une caractérisation chez le rongeur et surtout chez le primate de la capacité l' $\alpha$ -synucléine, à induire l'aggrégation, la propagation du message aggrégatif et enfin la neurodégénérescence. TARGET PD a donc modélisé de façon innovante la MP chez la souris et les primates l'interaction de ces causes de la mort cellulaire dans la MP.



Étude des conséquences de l'exposition (i) à des agrégats protéiques de différentes pathologies administrés (ii) dans le système nerveux central ou dans le système nerveux entérique chez le primate non humain.  
Dr. Celine Périer. Crédit : © Institut des Maladies Neurodégénératives.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Arotcarena ML, Bourdenx M, Dutheil N, Thiolat ML, Doudnikoff E, Dovero S, Ballabio A, Fernagut PO, Meissner WG, Bezard E, Dehay B. Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucleinopathies. *JCI Insight*, 2019; 4.
- ▶ Bourdenx M, Daniel J, Genin E, Soria FN, Blanchard-Desce M, Bezard E, Dehay B. Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases. *Autophagy*, 2016; 12: 472-83.
- ▶ Bourdenx M, Dovero S, Engeln M, Bido S, Bastide MF, Dutheil N, Vollenweider I, Baud L, Piron C, Grouthier V, Boraud T, Porras G, Li Q, Baekelandt V, Scheller D, Michel A, Fernagut PO, Georges F, Courtine G, Bezard E, Dehay B. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by alpha-synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun*, 2015; 3: 46.

Le projet TARGET PD est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en décembre 2012 et a duré 60 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 559 874 €.

## COORDINATEUR

Dr. Erwan Bézard : [erwan.bezard@u-bordeaux.fr](mailto:erwan.bezard@u-bordeaux.fr)  
Institut des Maladies Neurodégénératives, CNRS UMR 5293 /  
Université de Bordeaux II  
<http://www.imn-bordeaux.org/>

## X-PROTECT

## Potentiel neuroprotecteur de peptides dérivés de la protéine X du Bornavirus

## — Rappel des objectifs

Les maladies neurodégénératives représentent un enjeu majeur de santé publique, qui risque d'accroître en importance dans les années à venir avec le vieillissement global des populations. Il est donc essentiel d'identifier de nouvelles pistes permettant de bloquer ou de ralentir la mort neuronale. X-PROTECT cherche à exploiter la capacité naturelle développée par les virus qui, en tant que parasites obligatoires, ont adopté des stratégies visant à limiter la mort de leur cellules cibles afin d'optimiser leur survie. En outre, ces stratégies « pro-survie » sont probablement plus élaborées dans le cas des virus neurotropes, qui infectent des cellules post-mitotiques à capacité de renouvellement limitée. Notre projet a évalué le potentiel neuroprotecteur de protéines et de peptides dérivés du Bornavirus, un virus neurotrope qui persiste dans les neurones du cerveau de nombreuses espèces animales, sans provoquer directement la mort cellulaire. Ceci est lié à l'expression d'une protéine virale non-structurale, qui se localise dans la mitochondrie des neurones infectés et les protège de la mort cellulaire. Dans ce contexte, les objectifs d'X-PROTECT ont consisté à : (a) évaluer le potentiel neuroprotecteur de la protéine X du Bornavirus, en utilisant des modèles cellulaires et animaux de la maladie de Parkinson ; (b) concevoir des produits dérivés de la protéine X plus facilement utilisables en thérapie ; (c) déterminer une méthode d'administration non-invasive et évaluer le pouvoir neuroprotecteur de ces nouveaux composés.

## — Résultats majeurs

À l'aide de cultures neuronales compartimentalisées, nous avons montré que la protéine X du Bornavirus protégeait les neurones de la fragmentation axonale induite par diverses toxines, même lorsqu'elle était exprimée seule en dehors du contexte d'une infection. En outre, nous avons montré que la localisation mitochondriale de cette protéine était essentielle pour ses effets protecteurs et nous avons conçu des mutants de la protéine X avec un ciblage mitochondrial accru. Nous avons ensuite montré que la protéine X, lorsqu'elle est exprimée dans le cerveau de souris après injection stéréotaxique d'un lentivecteur dans la substance noire, protégeait les neurones dopaminergiques de la neurodégénérescence induite par la toxine MPTP, un modèle toxique de la maladie de Parkinson. Enfin, nous avons conçu un peptide dérivé de la partie C-terminale de la protéine X et fusionné à une séquence d'adressage mitochondrial. Ce peptide a démontré un potentiel neuroprotecteur comparable à celui de la protéine complète, non seulement en culture cellulaire mais aussi chez la souris intoxiquée par le MPTP. De façon intéressante, ce peptide a pu être administré par instillation intranasale pour être efficace, ce qui laisse espérer une approche simple et peu invasive pour protéger de la neurodégénérescence.

## — Production scientifique et valorisation

► Szelechowski, M., Bétourné, A., Monnet, Y., Thouard, A., Ferré, C.A., Peyrin, J.M., Hunot, S. and Gonzalez-Dunia D. Nature Communications 5:5181. doi: 10.1038/ncomms6181, 2014.

► Ferré CA, Davezac N, Thouard A, Peyrin JM, Belenguer P, Miquel MC, Gonzalez-Dunia\* D, Szelechowski\* M. FASEB Journal 30(4): 1523-33, 2016.

Brevet :

► Szelechowski, M., Bétourné, A., Hunot, S., Gonzalez-Dunia, D. Methods and pharmaceutical compositions for prevention or treatment of neurodegenerative diseases. EP14305874.1, 2014. US Extension N° 10,059,748, 2018.

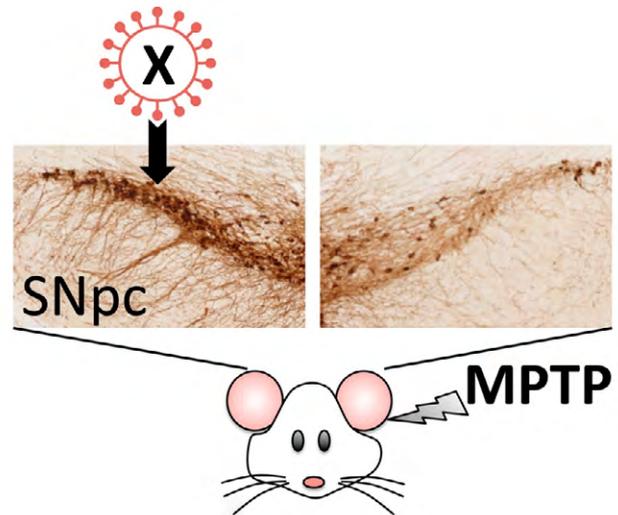


Figure 1 : Représentation schématique de la protection des neurones dopaminergiques de la substance noire qui est conférée par l'expression de la protéine X dans le cerveau d'un modèle murin de maladie de Parkinson induit par intoxication avec la toxine MPTP. Crédit : © Marion Szelechowski – Daniel Dunia – Stéphane Hunot.

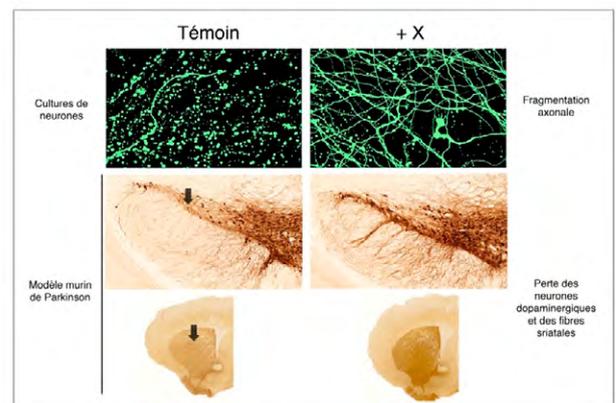


Figure 2 : Protection neuronale conférée par la protéine X du Bornavirus. Sur des cultures neuronales, la protéine protège contre la fragmentation axonale induite par des toxines mitochondriales (panneau du haut, marquage de la Tubuline neuronale, révélant la fragmentation axonale). Dans le modèle murin de maladie de Parkinson induit par la toxine MPTP, la protéine X, protège de la perte des corps cellulaires (en haut) ou des terminaisons axonales (en bas) des neurones dopaminergiques de la substance noire. Crédit : © Marion Szelechowski – Daniel Dunia – Stéphane Hunot.

**Le projet X-PROTECT** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mars 2013 et a duré 30 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 248 890 €.

**Partenaires :** ICM, Inserm, Paris, Inserm Transfert SA, Paris [partenaire valorisation].

**COORDINATEUR**

**Daniel Gonzalez-Dunia :** daniel.dunia@inserm.fr

CPTP, Inserm, Toulouse

<https://www.cptp.inserm.fr/en/research-teams/team-7-dunia-casper/>

# Maladie d'Alzheimer et Tauopathies

ADAMGUARD	p. 65	MetAlZ	p. 79
AD HOC	p. 66	MinAlpha7	p. 80
ADORATAU	p. 67	NeurobioPKR	p. 81
ATACTAD	p. 68	P2X7RAD	p. 82
BIOMARKAPD	p. 69	PERADES	p. 83
CholAD	p. 70	PREVENTAD	p. 84
CircProt	p. 71	SPREADTAU	p. 85
CoRehAlz	p. 72	SynflAD	p. 86
CYTOKALZ	p. 73	TAF	p. 87
GWAS in AD	p. 74	TaumiRNA	p. 88
HSG	p. 75	VADAD	p. 89
HuntAbeta	p. 76	VGLUTAD	p. 90
InVivoSTED	p. 77	ViAGeCo	p. 91
MAALAD	p. 78		

# ADAMGUARD

## Les réseaux protéiques associés aux récepteurs 5-HT<sub>4</sub> : gardes rapprochées du trafic de l'ADAM10 et de l'APP

### — Rappel des objectifs

#### ► Réduire la production de peptides amyloïdes toxiques

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative, à progression lente, provoquant une perte de mémoire associée à des troubles cognitifs importants. Au cours de cette pathologie, un déséquilibre se produit qui conduit à une surproduction par les cellules, et notamment par les neurones, du peptide amyloïde Aβ. L'accumulation de ce peptide est toxique et induit des défauts synaptiques associés à une mort neuronale. Nous avons montré que la présence à la membrane cellulaire du récepteur de la sérotonine de type 4 (5-HT<sub>4</sub>) permet de réduire la production de peptides amyloïdes. Ce garde du corps et ses associés modifient le trajet de la protéine précurseur du peptide Aβ et de l'alpha-sécrétase ADAM10 à l'intérieur de la cellule. Les objectifs du projet ADAMGUARD sont : – d'identifier les protéines partenaires du récepteur 5-HT<sub>4</sub> et d'expliquer comment elles contrôlent le trafic intracellulaire des acteurs impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer ; – de rechercher des composés activateurs de ce récepteur pour renforcer son action protectrice ; – de proposer des stratégies innovantes visant à diminuer la production des peptides amyloïdes afin de retarder la progression de la maladie d'Alzheimer.

#### ► Spectrométrie de masse, caractérisation fonctionnelle des partenaires protéiques et modèles murins

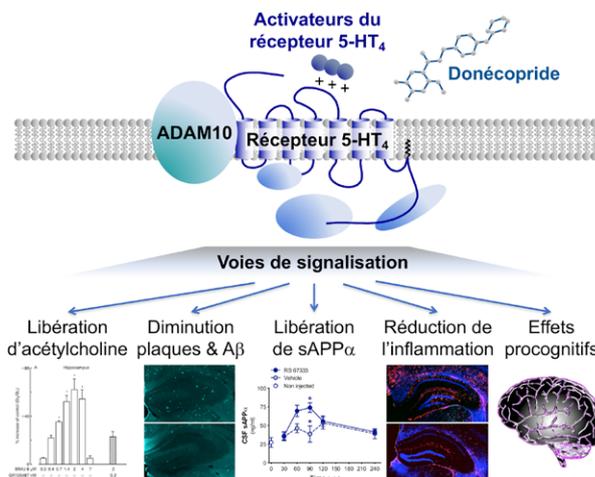
L'identification des protéines partenaires constituant le réseau associé au récepteur 5-HT<sub>4</sub> et à l'ADAM10 a été réalisée par spectrométrie de masse. Cette technologie permet de déterminer avec précision la composition en protéines d'un échantillon biologique. Cette approche non-biaisée a fourni une liste exhaustive des partenaires du réseau, parmi lesquelles nous avons focalisé notre attention sur les protéines les plus à même d'avoir une action dans le trafic intracellulaire. L'effet de la surexpression ou de la suppression de ces protéines d'intérêt sur la production de peptide amyloïde dans les cellules a été analysée. Nous avons également étudié dans des modèles cellulaires et *in vivo* l'effet de l'activation du récepteur lui-même par des molécules chimiques, candidats-médicaments. De nouveaux candidats-médicaments ont été validés à l'aide de modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer.

### — Résultats majeurs

Les analyses protéomiques nous ont permis de cibler plusieurs protéines du réseau associé au récepteur 5-HT<sub>4</sub> et à l'ADAM10 qui présentent un intérêt particulier dans le contexte de la maladie d'Alzheimer et dont nous poursuivons la caractérisation. Nous avons montré que l'administration chronique et précoce de molécules activant le récepteur 5-HT<sub>4</sub> ralentit le développement de la pathologie et empêche les pertes de mémoire de souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Nous avons réalisé une analyse longitudinale des dommages causés par les peptides amyloïdes sur la vascularisation cérébrale et sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. En collaboration avec deux équipes de l'Université de Caen, nous avons conçu une molécule double-cible innovante et prometteuse pour le traitement de la maladie d'Alzheimer : le donecopride. Deux brevets avec extension internationale ont été déposés.

### — Production scientifique et valorisation

► Rochais C. *et al.* (2019) *Brit J Pharmacol.* 177: 1988-2005. doi: 10.1111/bph.14964.



Effets bénéfiques obtenus, dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, lors de l'activation du récepteur de la sérotonine de type 4 (5-HT<sub>4</sub>) par des molécules activatrices ou des candidats-médicaments comme le donecopride. ADAM10 : alpha-sécrétase majeure cérébrale, responsable du clivage protecteur de la protéine précurseur de l'amyloïde. D'après Siniscalchi A., 1999 et Claeysen S., 2015.

- Baranger K. *et al.* (2017) *Neuropharmacology.* 126:128-141. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.031.
- Giannoni P. *et al.* (2016) *Neurobiol Dis.* 88:107-17. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.001.
- Claeysen S, Bockaert J, Giannoni P. (2015) *ACS Chem Neurosci.* 6:940-3. doi: 10.1021/acschemneuro.5b00135.
- Rochais C. *et al.* (2015) *J Med Chem.* 58:3172-87. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00115.
- Saraceno C. *et al.* (2014) *Cell Death Dis.* 5:e1547. doi: 10.1038/cddis.2014.492.
- Lecoutey C. *et al.* (2014) *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:E3825-30. doi: 10.1073/pnas.1410315111.
- Giannoni P. *et al.* (2013) *Front Aging Neurosci.* 5:96. doi: 10.3389/fnagi.2013.00096.
- Cochet M. *et al.* (2013) 4:130-40. doi: 10.1021/cn300095t.

#### Brevets

- Dallemagne P, Rochais C, Claeysen S. (2018) Combination of acetylcholinesterase inhibitor and 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist as neuroprotective agent in the treatment of neurodegenerative diseases. EP 18306278.5, PCT/EP2019/076129.
- Dallemagne P, Rochais C, Claeysen S. (2018) Donecopride as neuroprotective agent in the treatment of neurodegenerative diseases. EP 18306280.1, PCT/EP2019/076229.

Le projet ADAMGUARD est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mars 2013 et a duré 60 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 405 100 €.

#### COORDINATEUR

Joël Bockaert : joel.bockaert@igf.cnrs.fr  
IGF CNRS UMR 5203  
www.igf.cnrs.fr

## AD HOC

## Thérapie cellulaire et maladie d'Alzheimer : étude du potentiel thérapeutique et des mécanismes d'action des cellules souches olfactives humaines

## — Rappel des objectifs

En France, 900 000 personnes souffrent de la maladie d'Alzheimer. Outre la perte de mémoire, cette pathologie se caractérise par une importante mort cellulaire. Notre équipe a participé à la découverte des cellules souches adultes de la muqueuse olfactive humaine et, après avoir montré qu'elles permettent d'améliorer les symptômes locomoteurs dans un modèle rat de la maladie de Parkinson, nous avons pour objectif d'évaluer leur effet thérapeutique dans deux modèles murins de la maladie d'Alzheimer. Plus précisément, nous avons cherché à :

- ▶ évaluer le bénéfice thérapeutique de greffes de cellules souches olfactives ;
- ▶ caractériser les spécificités moléculaires et comportementales des souris transgéniques 5XFAD, modèle animal de la MA ;
- ▶ identifier certains des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la migration des cellules souches.

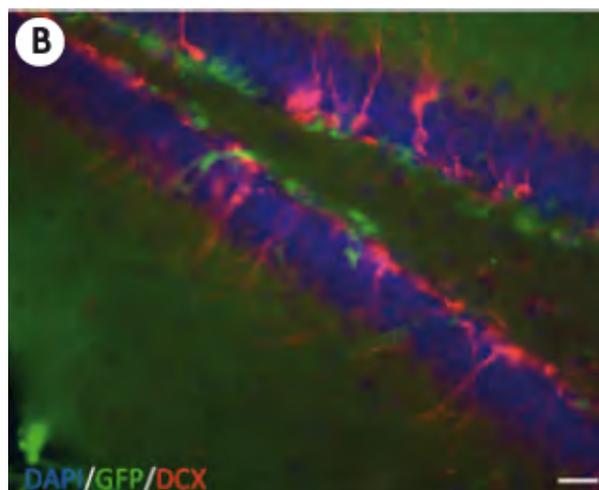
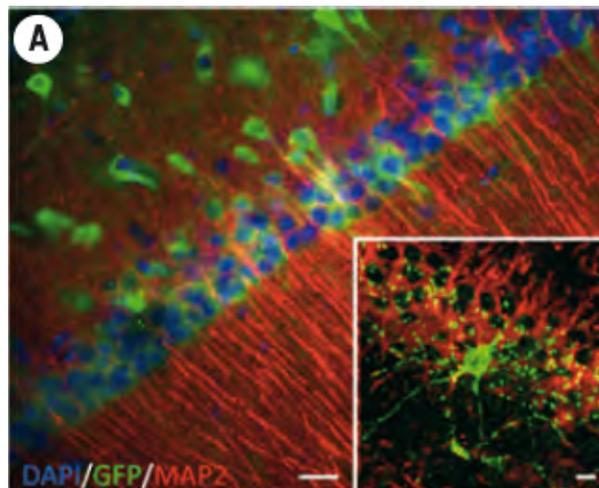
Nous avons utilisé trois types de stratégies méthodologiques complémentaires : i) des souris, modifiées ou non génétiquement, qui miment certains des symptômes de la maladie d'Alzheimer observés chez l'homme et qui nous ont permis d'évaluer le devenir des cellules souches après transplantation, soit dans le cerveau soit dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien, ii) des tests comportementaux, des matrices d'électrodes et des puces pangénomiques d'ADN pour mieux caractériser nos modèles animaux et identifier les facteurs qui pourraient expliquer la migration des cellules souches, iii) des cultures cellulaires et un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique afin d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'écotropisme des cellules souches et de leur action sur le tissu hôte.

## — Résultats majeurs

Nous avons découvert que les cellules souches olfactives humaines sont capables de se transformer en neurones et de rétablir des capacités d'apprentissage, après avoir été transplantées dans l'hippocampe ou le liquide céphalo-rachidien de souris amnésiques. Afin de procéder à des greffes encore moins invasives, nous avons réalisé une étude préliminaire indiquant que les cellules souches peuvent également migrer dans le cerveau lésé lorsqu'elles sont implantées dans la circulation sanguine. A l'aide d'une modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique, nous avons observé que les cellules souches sont capables de migrer au travers de cette barrière et découvert que la chimiokine Ccl2, produite par les zones d'inflammation cérébrale, attire les cellules souches. Enfin, nous avons participé à la caractérisation des souris transgéniques 5XFAD, modèle reconnu de la maladie d'Alzheimer, à l'aide d'outils tels que les puces ADN, les matrices d'électrodes et des tests comportementaux. L'ensemble de ces travaux nous a permis d'établir de nouveaux partenariats au niveau national et international dans les domaines de la recherche fondamentale et clinique.

## — Production scientifique et valorisation

Le programme AD HOC a permis de publier 14 articles. La majorité de ces publications reflètent le fruit de la coopération entre 2 ou 3 équipes du consortium, témoignant ainsi du dynamisme d'AD HOC pour la génération de connaissances et pour l'ouverture de voies de recherche originales sur la maladie d'Alzheimer qui devraient contribuer à terme à dessiner des stratégies thérapeutiques innovantes dans le domaine de la thérapie cellulaire.



Transplantation intracérébrale ou intraventriculaire de cellules souches de la muqueuse olfactive. Cinq semaines après transplantation, des cellules souches humaines de la muqueuse olfactive (GFP+/vertes) sont retrouvées dans les couches cellulaires hippocampiques des champs amoniens (A) et du gyrus dentelé (B). Les cellules humaines, après avoir migré, se sont intégrées aux réseaux neuronaux préexistants et possèdent majoritairement des caractéristiques phénotypiques et morphologiques (insert en A) de neurones. De plus, les cellules humaines stimulent la formation de nouveaux neurones endogènes exprimant la doublecortine (DCX+/rouge) (B). (barres d'échelles : 20 µm). Crédit : © Emmanuel NIVET (INP CNRS UMR705).

Le projet AD HOC est un projet collaboratif public-privé de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en mars 2011 et a duré 41 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 580 000 €.

Partenaires : IBMM CNRS UMR 5247, CNRS/AMU UMR 6149/7259, société VECT-HORUS.

## COORDINATEUR

François Feron : francois.feron@univ-amu.fr  
CNRS/AMU UMR6184 NICN

<https://inp.univ-amu.fr/en/teams/nose-nasal-olfactory-stemness-and-epigenesis>

# ADORATAU

## Récepteurs A<sub>2A</sub> et Tauopathie

### — Rappel des objectifs

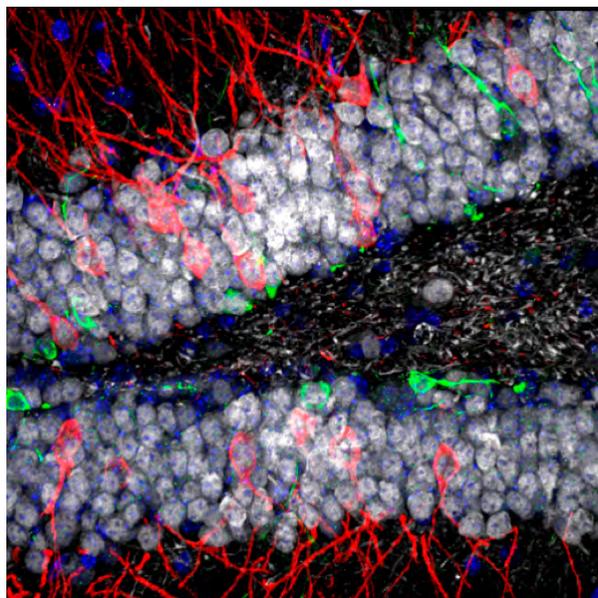
La consommation habituelle de caféine réduit les troubles cognitifs liés au vieillissement ainsi que le risque de développer la maladie d'Alzheimer (MA). Les effets centraux de la caféine sont en particulier liés à son action antagoniste des récepteurs adénosinergiques A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>Rs), dont l'expression cérébrale est anormalement élevée dans le contexte pathologique. Ces observations suggèrent que les effets bénéfiques de la caféine sont en lien avec le blocage de ces récepteurs dont la dysfonction participerait au développement de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, nos travaux se sont plus particulièrement intéressés au lien entre la Tauopathie, qui a un rôle primordial dans l'évolution des troubles mnésiques dans la maladie d'Alzheimer, et les A<sub>2A</sub>Rs avec les objectifs 1) de démontrer l'impact d'une dysfonction neuronale et astrocytaire des A<sub>2A</sub>Rs sur le développement de la tauopathie et de ses conséquences cognitives; 2) d'établir l'effet protecteur du blocage pharmacologique ou génétique du A<sub>2A</sub>R dans des modèles de la MA et 3) de développer de nouvelles molécules antagonistes des récepteurs.

### — Résultats majeurs

Nos données démontrent que le blocage pharmacologique (caféine/antagoniste) ou génétique des A<sub>2A</sub>Rs exerce un effet bénéfique sur les troubles mnésiques dans des modèles murins de la MA reproduisant les lésions Tau mais également amyloïde. Nos travaux sur les souris Tau démontrent que l'invalidation constitutive mais également le traitement par un antagoniste sélectif à un stade tardif de la pathologie réduit la pathologie Tau, les troubles mnésiques associés tout en normalisant la plasticité synaptique et la balance Glutamate/GABA dans l'hippocampe. Nos données anatomopathologiques démontrent par ailleurs une augmentation significative de l'expression neuronale des récepteurs dans le tissu de patients Alzheimer mais également atteints de démence lobaire fronto-temporale avec mutation de Tau, une tauopathie primaire. Grâce à un nouveau modèle triple transgénique généré au laboratoire, nous avons surexprimé de manière conditionnelle les récepteurs dans les neurones des souris Tau à un stade précoce. Nos données montrent que la dérégulation neuronale des récepteurs potentialise la perte synaptique et les troubles cognitifs liés à la pathologie Tau, par un mécanisme dépendant de la microglie. Les A<sub>2A</sub>Rs jouent donc un rôle central dans le lien Tauopathie et troubles mnésiques et s'avère être une cible thérapeutique à considérer dans le futur pour le traitement des Tauopathies. Dans cette perspective, nous avons développé de nouveaux antagonistes à partir d'études *in silico*. Cinq séries de molécules originales ont été synthétisées et leur affinité évaluée. Puis nous avons étudié la fonctionnalité, la sélectivité, les propriétés ADME et le passage de la BHE. Une série de dérivés se montre particulièrement intéressante et plusieurs molécules sont considérées pour des études comportementales.

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Flaten V *et al.* (2013) Biochemical Society Transactions 42(2):587-92.
- ▶ Laurent C *et al.* (2014) Neurobiology of Aging 35(9):2079-90.
- ▶ Moas-Héloire V *et al.* (2015) European Journal of Medicinal Chemistry 106, 15-25.
- ▶ Batalha VL *et al.* Scientific reports 6:31493
- ▶ Laurent C *et al.* (2016) Molecular Psychiatry 21(1):149
- ▶ Duroux, R. *et al.* (2017) J. Enz. Inhib. Med. Chem. 32, 850.



Surexpression neuronale des récepteurs A<sub>2A</sub> dans le Gyrus Denté de souris (A<sub>2A</sub> : rouge ; Doublecortin : vert ; NeuN : blanc ; DAPI : bleu).  
Crédit : © Emilie Faivre (INSERM UMRS-1172).

- ▶ Cellai L\* *et al.* (2018) Frontiers in Neuroscience 12:520.
- ▶ Faivre E *et al.* (2018) Frontiers in Molecular Neuroscience 11:235.
- ▶ Temido-Ferreira M *et al.* (2018) Molecular Psychiatry (in press). doi: 10.1038/s41380-018-0110-9.
- ▶ Duroux R *et al.* (2018). Eur J Med Chem 144:151-163.
- ▶ Boulahjar R *et al.* (2018). Bioorganic and Medicinal Chemistry 26, 3296-3307.
- ▶ Paiva I *et al.* (2019). Glia 67(12):2329-2342.
- ▶ Carvalho K *et al.* (2019) Brain 142(11):3636-3654.

**Le projet ADORATAU est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2013 et a duré 57 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 407 440 €.**

**Partenaire :** Université Charles-de-Gaulle Lille 3 EA4481.

#### **COORDINATEUR**

**David Blum :** david.blum@inserm.fr  
Inserm UMR-S1172 [ex U837], « Alzheimer & Tauopathies »  
<http://crjpa.fr/>

# ATACTAD

## Activation des acétyltransférases dans la maladie d'Alzheimer

### — Rappel des objectifs

Les troubles mnésiques sont un des symptômes majeurs de la maladie d'Alzheimer (MA) avant l'apparition de démences. Le contexte général du projet ATRACTAD est la recherche de nouveaux outils thérapeutiques basés sur les modulateurs des acétylations, pouvant permettre une amélioration de la plasticité et des capacités mnésiques dans la MA. L'acétylation réversible de la chromatine est une modification épigénétique qui joue un rôle fondamental dans les fonctions normales du cerveau car elle influence l'expression des gènes. Les acétylations sont régulées par deux familles d'enzymes : les histones acétyltransférases (HATs) catabolisent l'ajout d'un groupement acétyle et les histones déacétylases (HDACs) suppriment ce groupement. Au laboratoire, nous nous intéressons aux voies de régulation des acétylations dans la formation de la mémoire spatiale. Nous faisons l'hypothèse que certaines régulations par acétylation sont altérées au cours de la MA et impactent les capacités mnésiques des patients, notamment dans la formation de la mémoire à long terme. L'objectif de ce projet ATRACTAD est d'évaluer les mécanismes moléculaires liés aux acétylations (signatures épigénétiques et transcritomiques) mis en jeu lors d'un processus mnésique et ceux qui sont démantelés par la pathologie. Des analyses précliniques seront menées avec une molécule activatrice des acétyltransférases CBP/p300 chez l'animal normal et chez le modèle animal de MA pour établir si l'on peut améliorer la plasticité et les fonctions mnésiques, et ce, même dans un cerveau endommagé.

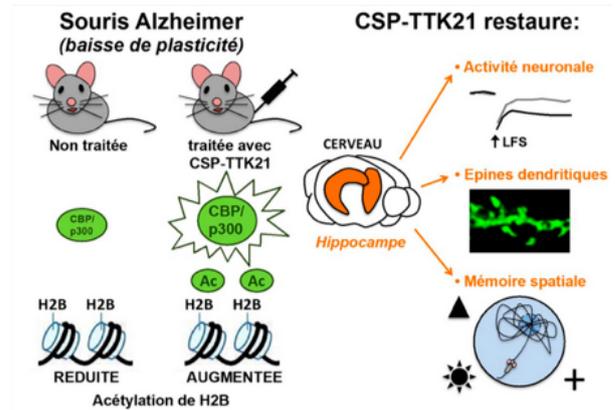
### — Résultats majeurs

#### Preuve de concept chez l'animal normal.

Un résultat marquant est la démonstration d'effets bénéfiques de l'injection d'une molécule activatrice des HAT chez l'animal normal. Cette molécule a été développée en collaboration avec un laboratoire indien (Pr. TK Kundu ; Brevet 2013). Jusqu'à présent, dû à la mauvaise perméabilité de ces molécules, aucun laboratoire n'avait utilisé de tels activateurs *in vivo*. Nous montrons que l'activation systémique des HAT CBP/p300 induit l'acétylation des histones dans le cerveau de souris, stimule la neurogenèse adulte en favorisant la maturation et la survie des neurones nouvellement générés et augmente la durée de rétention d'une mémoire spatiale.

#### Signatures épigénétique des tauopathies.

Nous avons utilisé des souris présentant des dégénérescences neurofibrillaires (lésions cérébrales de la maladie d'Alzheimer), les souris THY-Tau 22 (Drs D. Blum, L. Buée). À l'âge de 8 mois, elles présentent des déficits de mémoire, une baisse d'activité neuronale et une perte de la capacité à former des épines dendritiques (excroissances des neurones impliquées dans la mémoire). Nous montrons une altération importante des programmes génétiques dans l'hippocampe des souris malades lors d'une tâche d'apprentissage, ainsi que de l'acétylation de l'histone H2B à l'échelle du génome. L'injection de la molécule activatrice rétablit les niveaux d'acétylation de H2B dans le cerveau, ainsi qu'une partie des programmes génétiques. Une étude préclinique réalisée sur les souris « Alzheimer » montre une amélioration de la mémoire à long terme, de la formation des synapses et de la transmission synaptique. Le projet ATRACTAD a permis d'identifier des signatures épigénétique et transcriptomique associées à la dégradation de la plasticité neuronale et de la mémoire au sein du cerveau présentant des lésions de la maladie d'Alzheimer. Il a également montré qu'il était possible de



La molécule CSP-TTK21, en activant l'enzyme CBP/p300 dans le cerveau, permet de rétablir des modifications épigénétiques (comme l'acétylation de H2B) perdues au cours de la maladie d'Alzheimer dans l'hippocampe et de restaurer la plasticité neuronale, ainsi que les capacités de mémoire spatiale. Crédit : © Anne-Laurence Boutillier, Jean-Christophe Cassel.

contrecarrer ces dysfonctionnements et d'améliorer la plasticité et la mémoire en activant les HAT CBP/p300 dans le cerveau malade. Le maintien/rétablissement des capacités mnésiques chez les patients MA permettrait de reculer l'âge auquel ils perdent leur autonomie.

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Chatterjee S, *et al.* Reinstating plasticity and memory in a tauopathy mouse model with an acetyltransferase activator. *EMBO Mol Med.* 2018 Nov;10(11).
- ▶ Merienne K, Boutillier AL. [Epigenetic regulations and cerebral plasticity: towards new therapeutic options in neurodegenerative diseases?]. *Biol Aujourd'hui.* 2016;210(4):297-309.
- ▶ Chatterjee S\*, Mizar P\*, Cassel R\*, *et al.* A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice. *The Journal of Neuroscience.* \* first co-authors. 2013 Jun 26;33(26):10698-712.

Brevet : « A nanosphere - Histone Acetyltransferase (HAT) activator composition, process and methods thereof ». TK Kundu, AL Boutillier et al. International publication Number N° dépôt: WO 2013/160885 A1 ; date de dépôt : 31/10/2013.

De nombreuses conférences et posters ont été présentés à des congrès nationaux/internationaux.

**Le projet ATRACTAD est un projet collaboratif international de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en octobre 2012 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 445 630 €.**

**Partenaires :** Inserm, UMRS 1172 (ex U837) « Alzheimer & Tauopathies » (Lille), Transcription & Disease Laboratory, MGBU, JNCASR (Bangalore, Inde).

#### COORDINATRICE

**Anne-Laurence Boutillier** : laurette@unistra.fr  
Université Louis Pasteur Strasbourg 1 / CNRS UMR7237  
[www.lnca.cnrs.fr](http://www.lnca.cnrs.fr)

# BIOMARKAPD

## Biomarkers for Alzheimer's disease and Parkinson's disease

### — Rappel des objectifs

Les maladies d'Alzheimer et Parkinson ont une incidence qui augmente avec le vieillissement de la population et représentent ainsi un véritable enjeu de santé publique. Les traitements actuellement développés seront d'autant plus actifs qu'ils seront prescrits au stade précoce de ces maladies, stade où leur diagnostic est particulièrement difficile. C'est là que les biomarqueurs, actuellement en développement, peuvent trouver toute leur utilité en permettant d'orienter le diagnostic et de détecter les effets des thérapeutiques en développement. Ainsi, trois marqueurs biologiques du liquide céphalorachidien peuvent aider au diagnostic de maladie d'Alzheimer : il s'agit de la concentration de protéines TAU totale et de protéine TAU hyperphosphorylée, reflétant la dégénérescence axonale et celle de l'isoforme à 42 acides aminés du peptide  $\beta$  amyloïde. Pour la maladie de Parkinson, il s'agit du dosage de l'alpha-synucléine dans le liquide céphalorachidien. Cependant, d'importantes différences dans les mesures de ces biomarqueurs ont été rapportées entre les études, entre les centres et entre les laboratoires. Ces variations de résultats peuvent être dues à des facteurs pré-analytiques ou analytiques et nécessitent d'harmoniser des procédures standardisées pour la mesure des marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson. C'est le projet BIOMARKAPD.

### — Résultats majeurs

Dans BIOMARKAPD, nous avons mené des actions pour normaliser les mesures des biomarqueurs à travers toute l'Europe afin de définir comment recueillir des échantillons, comment effectuer les mesures et comment interpréter les résultats. Ces travaux incluent également la formation de différents personnels (techniciens, biologistes, praticiens). Nous avons également créé une biobanque avec des échantillons de patients bien caractérisés atteints des maladies d'Alzheimer et Parkinson, y compris des patients à un stade très précoce, ainsi que des contrôles neurologiques sains. Ces échantillons serviront à mettre au point de nouveaux essais et à tester de nouveaux et meilleurs candidats biomarqueurs. Enfin, nous avons contribué à la génération de matériaux de référence certifiés qui pourront être utilisés pour harmoniser les essais utilisés pour mesurer les différents biomarqueurs. Les résultats de notre projet auront une influence majeure sur la recherche clinique et le développement de médicaments pour les maladies neurodégénératives en général et pour les maladies d'Alzheimer et Parkinson en particulier. Ils auront un impact sur ce type d'efforts à l'échelle mondiale et feront de l'Europe un chef de file mondial dans ce domaine. Le nombre important de publications illustre la richesse de la participation des équipes françaises ayant débouché sur des résultats d'importance concernant 1/ la standardisation des phases préanalytiques et analytiques, 2/ la validation d'un protocole de validation des techniques d'immunoanalyse de biomarqueurs neurodégénératifs 3/ la mise en place d'une biobanque, 4/ la validation de protocoles d'utilisation clinique, 5/ établissement de liens forts entre équipes de chercheurs. Le consortium était de conception multidisciplinaire unique et comprenait des spécialistes des sciences fondamentales, des biochimistes, des cliniciens, des économistes de la santé et des épidémiologistes. De cette façon, tout le processus, de la découverte des biomarqueurs à la mise en œuvre, était couvert. La collaboration a été un tel succès que les partenaires ont décidé de mettre sur pied la société internationale « CSF Neurochemistry » pour pour-



Crédit : © DR.

suivre le travail sur le développement des essais, qui propose en 2020 son troisième meeting (A. Perret-Liaudet et S. Lehmann font partie de l'Advisory Board).

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ del Campo M, *et al. Biomark Med.* 2012 Aug;6(4):419-30.
- ▶ Molinuevo JL *et al. J Alzheimers Dis.* 2013 Jan 1;36(1):67-77.
- ▶ Molinuevo JL *et al. Alzheimers Dement.* 2014 Nov;10(6):808-17.
- ▶ Reijs BL *et al. Frontiers in neurology* 2015; 6: 216.
- ▶ Leitao, M. J *et al. Frontiers in neurology.* 2015;6:153.
- ▶ Hoglund K *et al. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2015;449:3-8.
- ▶ Fourier A *et al. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2015;449:9-15.
- ▶ Blennow K *et al. Alzheimers Dement.* 2015 Jan;11(1):58-69.
- ▶ Andreasson U *et al. Frontiers in Neurology* 2015;6:179.
- ▶ Winblad B *et al. Lancet Neurol* 2016 Apr; 15(5):455-532.
- ▶ Lelental N *et al. J Alzheimers Dis.* 2016 Mar 1.
- ▶ Vergallo A *et al. Alzheimers Dement.* 2018 Jul 26.

**Le projet BIOMARKAPD** est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en juin 2012 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 456 352 €.

**Partenaires :** 52 partenaires dont 3 Français : Hôpital de la Salpêtrière, Inserm IMMA ; CHRU Montpellier, IRB ; Hospices civils de Lyon, Université de Lyon.

#### COORDINATEUR

**Bengt Winblad**  
Karolinska Institute, Suède

# CholAD

## Non amyloid components of Alzheimer's disease: the cholesterol

### — State of the art and scientific aims

Research on AD has concentrated upon proteins that aggregate in the brain: A $\beta$  and tau. These proteins are insoluble and poorly diffusible and interact little with their environment. Toxicity at a distance from the aggregates implies interaction by diffuse molecules. Such molecules, associated with the aggregates, have not been intensely investigated. ApoE (the epsilon 4 haplotype being the major risk factor of AD) must be listed first among these candidate associated molecules. ApoE is a known transporter of cholesterol in the brain.

We hypothesized that altered homeostasis/regulation, of cholesterol and of other, still imperfectly characterized, membrane lipids as well as of ApoE and of other proteins implicated in lipid transports were involved in the etiopathogenesis of AD. The project has attempted to identify lipids and non amyloid proteins that are mediators of the pathology.

### — Main results

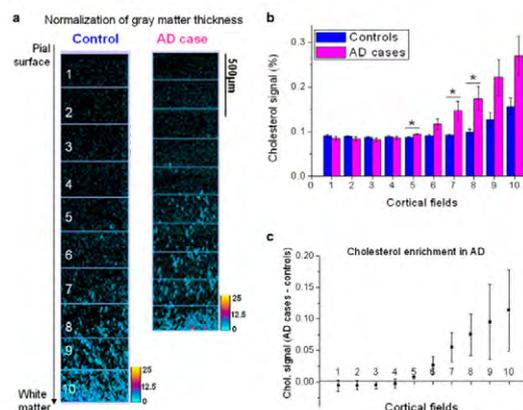
- We confirmed the accumulation of cholesterol identified by microdissection of human cerebral cortex, followed by LC-MS. Using TOF-SIMS imaging, we found an increase of the cholesterol signal in the deep layers of the cortex. Specific ceramides were also detected in the plaques (Cer d18:1/18:0 and Cer d18:1/20:0) while Cer d18:1/26:1 was decreased.. Data suggest that the increased concentration was the consequence of an increased activity of sphingomyelinase. The importance of the balance between sphingosine-1- phosphate and ceramide was also shown.

- From the recent GWAS study, we analyzed PICALM, a clathrin adaptor protein. We found that PICALM was abnormally cleaved in AD, co-localized with tau and was overexpressed in microglia.

- M.C.Potier, N. Cartier and her co-workers (ICM, Paris) showed that changes in the cholesterol concentration at the plasma membrane induced alteration of the topography of BACE (which was recruited in the rafts) and could explain the increase in A $\beta$  production. Cholesterol increase at the plasma membrane of neurons in culture could reproduce early molecular and cellular phenotypes of AD: changes in gene expression profiles, reminiscent of early AD stages, enlarged and aggregated early endosomes and increased amyloid- $\beta$ 42 secretion. In addition they showed that APP vesicular transport was inhibited in neuronal processes.

- B. Delatour injected A $\beta$  oligomers in wild type mice. Using both immunohistochemistry and mass spectrometry, they showed that the injection produced immediate and transitory behavioral effects. They tested oligomers made with and without lipids and found that no difference could be found in the effects.

- E. Rogava identified or confirmed Alzheimer disease risk loci (CR1, CLU, PICALM and Bin1) - W. Zhang developed double transgenic mice Abcg2-KO/Tg-SwDI. Abcg2 deficiency augmented oxidative stress and cognitive defects in the AD mice. In vitro ApoE2 protected astroglial cells from A $\beta$ 42-induced inflammatory response, which was, on the contrary, promoted by ApoE4. 3). Insulin signaling, in neuronal N2a cells, reduced cholesterol levels/metabolism at early time points as well as A $\beta$  production. A number of TFs/signaling pathways that were activated or down regulated by insulin or/and A $\beta$  peptides were identified.



Cholesterol-enrichment in the deep layers of the neocortex in Alzheimer's disease cases. a, Normalisation procedure and its application to TOF-SIMS images. b, Comparison between the cholesterol signal in each field in control and AD cases. c, Differences between the cholesterol in control and AD cases. From Lazar *et al.*, 2013.

### — Scientific outcomes

- ▶ Ando K *et al.* (2013) Acta Neuropathol 125:861–78. doi: 10.1007/s00401-013-1111-z.
- ▶ Ando K *et al.*, (2016) Neurobiol Dis 94:32–43. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.017.
- ▶ Ceccom J *et al.*, (2014) Acta Neuropathol Commun 2:12. doi: 10.1186/2051-5960-2-12.
- ▶ Epelbaum S *et al.*, (2015) Neurobiol Aging. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005.
- ▶ Jun G *et al.*, (2010) Arch Neurol 67:1473–1484. doi: 10.1001/archneurol.2010.201.
- ▶ Lazar AN *et al.*, (2013) Acta Neuropathol 125:133–44. doi: 10.1007/s00401-012-1041-1.
- ▶ Lee JH *et al.*, (2011) Arch Neurol 68:320–8. doi: 10.1001/archneurol.2010.292.
- ▶ Marquer C *et al.*, (2011) FASEB J 25:1295–305. doi: 10.1096/fj.10-168633.
- ▶ Marquer C *et al.* (2014). Mol Neurodegener 9:60. doi: 10.1186/1750-1326-9-60.
- ▶ Panchal M *et al.*, (2014) Neurobiol Dis 65:193–201. doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.010.
- ▶ Reitz C *et al.*, (2011) Arch Neurol 68:99–106. doi: 10.1001/archneurol.2010.346.
- ▶ Reitz C *et al.*, (2011) Ann Neurol 69:47–64. doi: 10.1002/ana.22308.

**Le projet CholAD** est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2011 et a duré 47 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 435 000 € (3 partenaires français).

**Partenaires** : France : Inserm Paris V, Université Paris V René Descartes / Université Paris VII Denis Diderot. Canada : Université de Toronto, Université de Montréal, Université d'Ottawa.

#### COORDINATEUR

**Charles Duyckaerts** : charles.duyckaerts@aphp.fr  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Paris 6

# CircProt

## Protection des circuits synaptiques dans les maladies d'Alzheimer et de Huntington, rôle de BDNF et TrkB

### — Rappel des objectifs

Les maladies de Huntington (HD) et d'Alzheimer (AD) sont toutes deux fortement associées à des déficiences liées au Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF, facteur neurotrophique essentiel pour le développement et la fonction synaptique et maintenance des circuits neuronaux. Bien que le BDNF soit neuroprotecteur, le développement de stratégies thérapeutiques liées au BDNF a été limité par le manque de connaissances sur les mécanismes qui régulent sa synthèse, son transport et sa libération ainsi que sa signalisation via son récepteur TrkB dans AD et HD. L'objectif de ce consortium était donc d'identifier des stratégies pour améliorer et mobiliser la synthèse endogène du BDNF, son trafic, et la signalisation de TrkB dans le traitement de la dysfonction synaptique et la dégénérescence observées dans HD et AD. L'analyse en parallèle des défauts synaptiques dans AD et HD associés aux dysfonctionnements des circuits neuronaux et leur restauration par des molécules nous aideront à identifier les mécanismes cellulaires communs et/ou divergents pour ces deux maladies.

### — Résultats majeurs

#### 1) Développement et validation de circuits neuronaux modèles de HD

Une étape essentielle pour valider des molécules et des stratégies thérapeutiques a été de reconstituer sur puces microfluidiques des réseaux neuronaux corticostriataux normaux et modèles de pathologies comme HD et le syndrome de Rett, une maladie neurodéveloppementale pour laquelle le BDNF joue également un rôle majeur. Par cette approche, nous avons développé et caractérisé les différentes étapes de développement et de maturation du circuit (Moutaux *et al.*, 2018). Ces puces ont démontré que la régulation du métabolisme du cholestérol permet de rétablir le trafic et la signalisation BDNF/TrkB dans un circuit HD (Kacher *et al.*, 2019). Enfin, nous avons développé un circuit microfluidique modèle du syndrome de Rett en réduisant la protéine MeCP2 et avons pu montrer que l'activation du transport endogène de BDNF via l'activation de la phosphorylation de la protéine huntingtine permet de rétablir le fonctionnement synaptique et améliore les symptômes chez les souris Rett (Ehninger *et al.*, In Press).

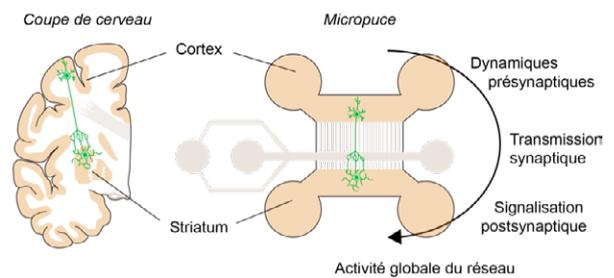
#### 2) Analyse du potentiel thérapeutique du FTY720 dans un modèle d'AD.

Nous avons analysé si un traitement chronique au FTY720 (fingolimod), un composé chimique anti-inflammatoire impactant les taux de BDNF et déjà utilisé en clinique pour une autre maladie neurologique, pouvait contrer la pathologie dans le modèle APP-PS1 de l'AD. Nous avons montré que l'injection intra-péritonéale de FTY720 durant 1 à 2 mois normalise la plasticité synaptique, évite la perte d'épines dendritiques, atténue la neuroinflammation et restaure la cognition dans ce modèle (Kartalou *et al.* soumis).

#### 3) Analyse de l'impact du fragment C-terminal de l'APP (AICD) sur la fonction neuronale

Afin d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques innovantes pour combattre l'AD, il est nécessaire de mieux comprendre les déficits de la fonction neuronale qui la caractérise. Pour cela, nous avons analysé comment l'augmentation des taux d'AICD, un peptide qui s'accumule dans les modèles animaux de l'AD et aussi chez des patients humains, impacte l'excitabilité

### Reconstruction de réseaux neuronaux sur micropuces



Les réseaux microfluidiques permettent de reconstituer des circuits neuronaux reproduisant des pathologies comme la maladie de Huntington ou le syndrome de Rett (circuit cortico-striatal, ou de la maladie d'Alzheimer (réseaux cortico-hippocampal ou cortico-cortical de neurones).  
Crédit : © M Cazorla / F Saudou.

neuronale. Nous avons montré que son augmentation dans le noyau réduit l'excitabilité des neurones excitateurs de l'hippocampe modifiant les oscillations en réseau et les tâches mnésiques associés (Pousinha *et al.* 2019).

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Moutaux E *et al.* (2018). Neuronal network maturation differently affects secretory vesicles and mitochondria transport in axons. *Scientific Reports*. 8(1):13429.
- ▶ Kacher R *et al.* (2019) CYP46A1 gene therapy deciphers the role of brain cholesterol metabolism in Huntington's disease. *Brain*. 142(8):2432-2450.
- ▶ Ehinger Y *et al.* (2019) Huntingtin phosphorylation governs BDNF homeostasis and improves the phenotype of Mecp2 knockout mice, *Embo Molecular Medicine* In Press bioRxiv 643312; doi: <https://doi.org/10.1101/643312>
- ▶ Kartalou G-I (2020) Anti-inflammatory treatment with FTY720 starting after onset of symptoms reverses synaptic and memory deficits in an AD mouse model. (under review *Neuropsychopharmacology*). bioRxiv 868026 doi: <https://biorxiv.org/cgi/content/short/2019.12.15.868026v1>
- ▶ Pousinha PA *et al.* (2019) The Amyloid Precursor Protein C-Terminal Domain Alters CA1 Neuron Firing, Modifying Hippocampus Oscillations and Impairing Spatial Memory Encoding. *Cell Rep*. 29(2):317-331.e5.

Le projet CircProt est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en avril 2016 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 389 792 €.

**Partenaires :** Heinrich-Heine-University (Allemagne), University of Helsinki (Finlande), CNRS UMR7275 (France), GIN Inserm U1216 UGA (France), National Research Council (Italie), University of Milano (Italie), University of Bergen (Norvège).

#### COORDINATEUR

Volkmar Lessmann

Otto-von-Guericke-University [Allemagne]

<https://www.circprot.eu/>

#### CONTACTS :

Frédéric Saudou : [frederic.saudou@inserm.fr](mailto:frederic.saudou@inserm.fr)

Hélène Marie : [marie@ipmc.cnrs.fr](mailto:marie@ipmc.cnrs.fr)

# CoRehAlz

## Mécanismes cellulaires, moléculaires et systémiques sous-tendant l'établissement d'une réserve cognitive dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

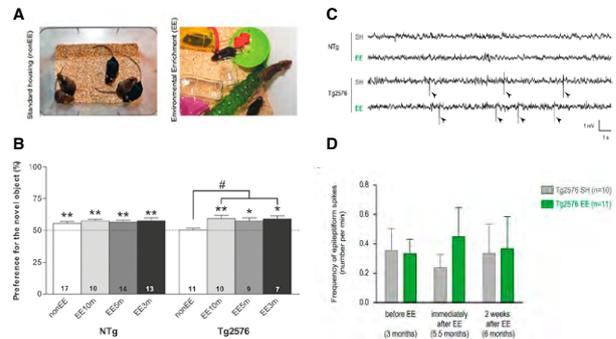
### — Rappel des objectifs

Notre projet est basé sur des preuves cliniques et épidémiologiques considérables montrant que l'activité et le style de vie peuvent réduire le risque de développer la MA. Le modèle de réserve cognitive suggère que les personnes ayant une plus grande capacité de réserve du cerveau peuvent développer une résistance aux effets neurodégénératifs et optimiser leurs capacités de comportement par le recrutement différentiel des réseaux de neurones et / ou l'utilisation de stratégies cognitives alternatives. Notre projet avait comme objectif de déchiffrer les mécanismes cellulaires, moléculaires et les systèmes mis en jeu pour établir la réserve cognitive du cerveau qui sous-tend la résistance aux dommages neuropathologiques associés à la MA.

### — Résultats majeurs

Les données des études épidémiologiques et des modèles animaux suggèrent que la progression de la MA peut être modulée par des facteurs environnementaux. Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'expression des effets modulateurs de l'environnement, en particulier les niveaux d'activité physique et mentale, commencent à être élucidés. Bien que les effets de l'enrichissement environnemental (EE) au long de la vie dans les modèles souris de la MA sont étudiés, nous nous sommes concentrés sur des périodes de temps spécifiques, caractérisant les principales étapes du développement de la maladie dans nos souris MA (Tg2576). Les souris de la lignée Tg2576 surexpriment l'isoforme 695 de hAPP avec la double mutation suédoise sous le contrôle du promoteur de hamster de la protéine prion. Ces souris présentent de l'amyloïde diffus et des dépôts A $\beta$  focaux, et des troubles cognitifs liés à l'âge. Les souris Tg2576 présentent une progression lente de la maladie, et donc principalement imitent les étapes prodromiques de la MA. L'originalité de notre approche repose sur le fait que l'exposition à l'EE a lieu précocément au cours de la vie et a une durée restreinte. Cette exposition courte et précoce des souris Tg2576 permet l'établissement d'une réserve cognitive cérébrale robuste dans le temps. Nous avons caractérisé la cinétique des effets de l'EE sur les fonctions mnésiques chez les souris modèles de la MA, cartographié la dynamique des réorganisations des réseaux hippocampo-corticaux au cours des processus de mémoire spatiale chez des souris MA âgées exposées précocément au milieu enrichi. Des enregistrements électrophysiologiques ont permis d'exclure l'influence de l'EE sur le phénotype épileptique des souris MA. Nous avons caractérisé les effets de l'EE sur la réorganisation et la réactivité du réseau vasculaire des souris MA et l'amyloïdogenèse dans les compartiments neuro-naux et vasculaires des souris MA a été étudiée.

Nos travaux confortent l'idée que l'utilisation de paradigmes de stimulation de la réserve cérébrale cognitive, seule ou combinée à l'utilisation de traitements pharmacologiques, est une stratégie efficace pour protéger le cerveau. En l'occurrence, nos données révèlent que ces paradigmes s'avèrent capables non seulement de compenser certains déficits mnésiques, mais également d'agir au niveau neuronal pour corriger, au moins partiellement, l'organisation synaptique et la plasticité neuronale. Ainsi, nous avons identifié des altérations biologiques en amont de l'apparition des signes cliniques de la maladie, ce qui suggère que ces travaux doivent être poursuivis dans l'idée de caractériser le plus tôt possible la survenue de la pathologie.



A : souris élevées en milieu standard (SH), (gauche) ou exposées à l'EE en stimulations (droite) ;

B : L'EE restaure la mémoire de reconnaissance des souris Tg2576.

C : Tracés EEG de souris non transgéniques (NTg) ou Tg2576 de 6 mois hébergées en SH ou en EE. Seules les Tg2576 présentent des pointes interictales (flèches).

D : Fréquence des pointes interictales des souris Tg2576 hébergées en SH ou en EE, avant (à 3 mois), immédiatement après (5,5 mois) et 2 semaines après l'enrichissement (6 mois).

Crédit : © d'après Verret *et al.* 2013 ; Bezzina *et al.* 2015.

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Verret L. *et al.* (2013) *Neurobiol Aging*, 34(1): 211-25.
- ▶ Krezymon *et al.* *Plos One* (2013) 27;8(9).
- ▶ Bezzina C *et al.* (2015) *Plos One*, 13; 10(3).
- ▶ Bezzina C *et al.* (2015) *Front. Aging Neurosci.* 23;7: 178.
- ▶ Verret L. & Rampon C Imperial College Press (vol 7) (2013).
- ▶ Bezzina C. et Rampon C. (2013) *La Revue de Neuropsychologie* 5(4), 293-7.

Le projet CoRehAlz est un projet de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en janvier 2011 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 580 000 €.

Partenaires : CNRS CNIC / Université Bordeaux 1.

#### COORDINATRICE

Claire Rampon : [claire.rampon@univ-tlse3.fr](mailto:claire.rampon@univ-tlse3.fr)  
 CNRS CRCA / Université Paul Sabatier  
<http://cbi-toulouse.fr/fr/equipe-rampon>  
<http://cognition.ups-tlse.fr>

## CYTOKALZ

## Processus inflammatoires périphériques dans la maladie d'Alzheimer : étude physiopathologique et diagnostique

## — Rappel des objectifs

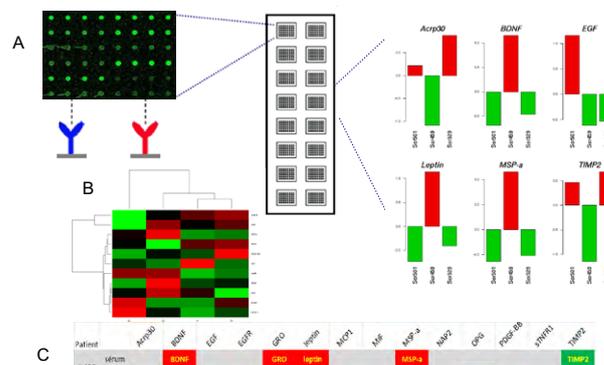
La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative et évolutive, caractérisée par une perte progressive d'autonomie fonctionnelle. La MA représente la cause majeure de démence dans les pays occidentaux et le nombre de patients atteints de cette maladie est en constante progression du fait de l'espérance de vie croissante et du vieillissement de la population. Cette pathologie est ainsi devenue une préoccupation majeure de santé publique, et ce d'autant plus que la prise en charge de ces patients représente un coût économique considérable. La maladie est caractérisée par la présence de 2 processus neuro-pathologiques (les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes [plaques séniles]), dont la détection permet de poser le diagnostic de la pathologie. Le dosage des biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (LCR, diminution des peptides Aβ1-42, augmentation des protéines Tau et p-Tau) constitue une aide précieuse au diagnostic de la MA et de ses formes prodromiques, mais le défi aujourd'hui réside dans l'identification de biomarqueurs dont le dosage pourrait être effectué dans le sang, ce qui faciliterait grandement le diagnostic et donc la prise en charge rapide des patients concernés.

L'inflammation intra-cérébrale est une caractéristique de la MA, consécutive à la souffrance neuronale et à l'accumulation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires. Les modèles murins de la MA montrent que les cellules immunitaires périphériques peuvent par ailleurs être recrutées du sang vers le cerveau, modulant ainsi l'expression de la maladie. Il a également été suggéré que la neuro-inflammation pouvait également être un facteur dans l'initiation de la maladie. Des études supplémentaires ont ainsi décrit des taux anormaux de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance dans le LCR et le sang de patients atteints de la MA. Cependant, le rôle exact de l'inflammation dans la neurodégénérescence reste sujet à controverses et ses conséquences majoritairement délétères pour le cerveau.

L'étude CYTOKALZ avait pour objectif d'évaluer l'implication des processus inflammatoires dans la MA. Pour cela, nous avons développé une approche ambitieuse, basée sur l'utilisation de technologies hautement performantes en protéomique et permettant la caractérisation multiplexe et sensible de biomarqueurs protéiques. L'analyse de ces biomarqueurs inflammatoires a ainsi été menée dans le LCR et le plasma de patients atteints de démence de type MA, mais aussi dans le plasma d'animaux issus d'un modèle murin de cette pathologie (souris THY-Tau22).

## — Résultats majeurs

L'étude CYTOKALZ a permis de détecter dans les modèles animaux et chez les patients un large éventail de protéines pro-inflammatoires, validant ainsi l'informativité pour le diagnostic de la MA de biomarqueurs sanguins décrits dans la littérature. Ce projet a ainsi permis d'identifier de nouveaux candidats présents dans le LCR et le plasma (IL-8, TNFR1, TIMP-1, sIL6R), dont le dosage, en association avec les tests actuellement réalisés en pratique clinique, pourrait constituer une plus-value pour le diagnostic ou le dépistage ou le suivi de cette maladie. La validité de ces nouveaux candidats a par ailleurs été testée au sein d'une cohorte élargie de patients disposant d'un suivi longitudinal, permettant ainsi d'évaluer leur performance prédictive du déclin cognitif.



A : des puces à anticorps sont utilisées pour analyser les prélèvements et quantifier les différentes cytokines.  
B : des analyses biostatistiques permettent de regrouper les biomarqueurs présentant des modifications d'expressions  
C : des mesures individuelles avec des approche cibées (Meso-Scale-Discovery) permettent de confirmer les observations.  
Crédit : © LBPC CHU Montpellier.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Central Nervous System and Peripheral Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease: Biomarker Profiling Approach. Delaby C, Gabelle A, Blum D, Schraen-Maschke S, Moulinier A, Boulanghien J, Séverac D, Buée L, Rème T, Lehmann S. *Front Neurol.* 2015 Aug 24;6:181. doi: 10.3389/fneur.2015.00181. eCollection 2015. PMID: 26379616.
- ▶ Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. Laurent C, Dorothée G, Hunot S, Martin E, Monnet Y, Duchamp M, Dong Y, Légeron FP, Leboucher A, Burnouf S, Faivre E, Carvalho K, Caillierez R, Zommer N, Demeyer D, Jouy N, Sazdovitch V, Schraen-Maschke S, Delarasse C, Buée L, Blum D. *Brain.* 2017 Jan;140(1):184-200. doi: 10.1093/brain/aww270. Epub 2016 Nov 5. PMID: 27818384.
- ▶ Increased tauopathy drives microglia-mediated clearance of beta-amyloid. Chen W, Abud EA, Yeung ST, Lakatos A, Nassi T, Wang J, Blum D, Buée L, Poon WW, Blurton-Jones M. *Acta Neuropathol Commun.* 2016 Jun 23;4(1):63. doi: 10.1186/s40478-016-0336-1. PMID: 27339073.

Un article supplémentaire est en cours de préparation, dans le cadre de l'extension de cette étude par le biais d'un autre projet collaboratif (CHU Poitiers, Pr M.Paccalin).

**Le projet CYTOKALZ est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2012 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 560 865 €.**

**Partenaires :** INSERM Montpellier, INSERM Lille.

**COORDINATEUR**

**Sylvain Lehmann** : s-lehmann@chu-montpellier.fr  
CHU Montpellier

# GWAS in AD

## GWAS in AD: focus on miRNA

### — Rappel des objectifs

Jusqu'à présent, les analyses des études d'association pangénomique (GWAS) ont identifié des dizaines de loci, contenant quelques centaines de gènes, génétiquement associés à la maladie d'Alzheimer (MA). Cependant, aucun gène n'est clairement identifié comme étant un coupable, et des stratégies supplémentaires sont nécessaires pour réduire la liste des candidats. Les microARN sont de petits ARN endogènes non codants qui fonctionnent pour réprimer la production de protéines et ont été impliqués dans les maladies neurodégénératives.

Au cours des dernières années, nous avons identifié un certain nombre de polymorphismes mononucléotidiques (SNP) dans le gène APP affectant la liaison des microARN, conduisant potentiellement à un risque accru de MA. Nos observations suggèrent que plusieurs polymorphismes associés à la MA abrogent la fonction des microARN. Notre objectif est d'explorer en détail la relation entre les données GWAS et les microARN.

À cette fin, nous profitons de notre expertise unique en génétique, biologie moléculaire, études animales et humaines.

### — Résultats majeurs

Nous avons identifié une poignée de miARN clés et de cibles génétiques (en particulier les gènes à risque de MA) susceptibles d'être impliqués dans le développement de la maladie. Une attention particulière est désormais portée au gène *Fermt2* impliqué dans l'APP et la production de bêta-amyloïde. Nous pensons que tout changement dans *Fermt2* pourrait contribuer au risque de MA sporadique.

Ces travaux ont aussi contribué à l'étude / développement de jeunes chercheurs dans tous les laboratoires. Cette subvention a permis le développement de collaborations nationales (Paris, Rouen) et internationales (KU Leuven, Belgique et DRI, IOB, UCL, Royaume-Uni). Il a également fourni un effet de levier sur le rôle du tau dans la régulation des gènes. Enfin, il est à noter qu'il s'agit de l'un des premiers fonds français Coen suite à la sélection du Centre d'excellence français en neurodégénérescence (LiCEND à Lille). Il a également bénéficié de l'effet levier apporté par le LabEx DISTALZ.

Dans l'ensemble, ce projet a aidé à découvrir les rôles sans précédent des loci associés à la MA. Cela permet de préciser certaines voies impliquées dans la ou les causes de la MA sporadique et d'ouvrir la porte à de nouveaux biomarqueurs et voies thérapeutiques.

### — Production scientifique et valorisation

- Delay C, Grenier-Boley B, Amouyel P, Dumont J, Lambert JC (2016) miRNA-dependent target regulation: functional characterization of single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 24;8(1):20.
- Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, et al. (2017) Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol* 133(6):955-966.
- Lebouvier T, Pasquier F, Buée L (2017) Update on Tauopathies. *Curr Op Neurol*, 30(6):589-598.
- Benhelli-Mokrani H, Chauderlier A, Mansuroglu Z, et al. (2018) Genome-wide identification of neuronal DNA regions bound by Tau protein under physiological and stress conditions. *Nucleic Acids Res*, 46(21):11405-422.

Polymorphismes associés à la maladie d'Alzheimer dans des sites cibles de microARN identifiés in silico, avec la fréquence d'allèles mineurs correspondante, les odds ratio (OR) et l'effet potentiel sur la liaison des microARN (modifié d'après Delay et al., 2016).

Gène	PolymiRTS	Allèle mineure	MAF (%)	OR	95 % CI	miRNA	Conséquence	Effet attendu sur l'expression
<i>FERMT2</i>	rs7143400	T	10.08	1.09	1.04-1.15	hsa-miR-4504	Appariement parfait	Diminution
<i>MS4A2</i>	rs2847655	C	41.09	0.90	0.87-0.93	hsa-miR-585-3p	Perturbation de l'appariement	Augmentation
						hsa-miR-3945	Appariement parfait	Diminution
						hsa-miR-6876-3p	Perturbation de l'appariement	Augmentation
<i>MS4A6A</i>	rs610932	A	42.49	0.91	0.88-0.94	hsa-miR-626	Perturbation de l'appariement	Augmentation
						hsa-miR-6888-3p	Appariement parfait	Diminution
<i>NUP160</i>	rs9909	C	33.75	0.93	0.90-0.96	hsa-miR-3976	Appariement parfait	Diminution
						hsa-miR-1185-1-3p	Perturbation de l'appariement	Augmentation

Abréviations : MAF Fréquence des allèles mineurs, PolymiRTS Polymorphismes dans les sites cibles miARN, miR & miRNA microARN

Un résumé des gènes, des polymorphismes mononucléotidiques, de l'identité des allèles mineurs par rapport au brin de la région non traduite 3', du MAF et de l'OR [IC à 95 %], les miARN affectés, les effets des PolymiRTS associés à la maladie d'Alzheimer identifiés dans Delay C *et al.* (2016) et les conséquences prévues. Crédit : © ISITE-ULNE de Lille.

- Sierksma A, Lu A, Salta E, Vanden Eynden E, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Blum D, Buée L, Fiers M, De Strooper B (2018) Deregulation of neuronal miRNAs induced by either amyloid- $\beta$  or TAU pathology. *Mol Neurogener*, 13(1):54.
- Boscher E, Husson T, Quenez O, et al. (2019) Copy Number Variants in miR-138 as a Potential Risk Factor for Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 68(3):1243-1255.
- Sierksma A, Lu A, Salta E, Mancuso R, Zoco J, Blum D, Buée L, De Strooper B, Fiers M (2020) Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid  $\beta$  but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med* (2020) 12: e10606.
- Eysert, F., Coulon, A., Boscher, E. *et al.* Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Mol Psychiatry* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>

Le projet GWAS in AD est un projet collaboratif international de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en mars 2016 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 313 600 €.

Partenaires : Institut Pasteur de Lille U1167, Inserm UMR 1172, France.

#### COORDINATEUR

Sébastien Herbert

Université de Laval (Canada)

#### CONTACT :

Luc Buée : [luc.buee@inserm.fr](mailto:luc.buee@inserm.fr)

<http://lucbuee.fr/>

## HSG

## Harmonized Hippocampal Subfield Segmentation Working Group

## — Rappel des objectifs

Le lobe temporal médian (LTM) est une des régions cérébrales les plus étudiées dans le domaine du vieillissement normal et pathologique. La mesure *in vivo* du volume du LTM est classiquement utilisée de façon clinique afin de détecter la MA. Cependant, cette mesure isolée n'est pas suffisamment fiable et sensible. Or, le LTM est composé de plusieurs sous-régions qui se distinguent dans leur structure et leur fonction. De façon intéressante, ces régions sont différenciellement sensibles aux effets du vieillissement et de la MA, et la mesure de certaines sous-régions du LTM permet de détecter plus précisément les stades précoces de la maladie.

L'IRM *in vivo* à très haute résolution offre l'opportunité de mesurer les sous-régions du LTM avec précision. Cependant, les résultats rapportés dans la littérature dans le cadre de la MA sont très variables. Cette divergence peut s'expliquer par des différences méthodologiques, notamment concernant la définition anatomique des régions, qui varie fortement d'un protocole de segmentation à un autre. Cette absence alarmante de consensus est en grande partie due à un manque de protocoles de segmentation harmonisés pour les sous-régions du LTM, à la fois pour les sous-champs hippocampiques et les régions corticales adjacentes.

La solution permettant de remédier à ce problème méthodologique est donc de développer un protocole de segmentation harmonisé fiable et validé par les experts du domaine. L'objectif est également de créer un protocole qui peut être appliqué à toutes les populations d'âge et de santé variables. Cette initiative a été lancée en 2013 par le Harmonized Hippocampal Subfield Segmentation Working Group (HSG ; <http://hippocampalsubfields.com/>).

## — Résultats majeurs

Les équipes du HSG se sont concentrées sur l'élaboration d'un protocole de segmentation des sous-champs hippocampiques, en se focalisant spécifiquement sur la partie antérieure de ces structures. Cette portion de l'hippocampe est particulièrement compliquée à segmenter, principalement à cause de sa complexité anatomique et du manque de descriptions histologiques disponibles. Pour ces raisons, la partie antérieure de l'hippocampe est rarement segmentée par les chercheurs utilisant l'IRM 3T *in vivo*.

Nous avons obtenu des échantillons histologiques de la tête de l'hippocampe ainsi que des annotations réalisées par les neuroanatomistes impliqués dans le HSG. Pour chacun des échantillons, nous avons obtenu au moins deux ensembles de segmentation afin de caractériser les différences entre les laboratoires de neuroanatomie. La collecte de ces échantillons a permis de mettre en place une base de données unique concernant la tête d'hippocampe, qui s'étend bien au-delà des atlas publiés auparavant.

Grâce au soutien financier du JPND, les équipes ont pu se rencontrer aux États-Unis, au Canada et au Royaume-Uni. La possibilité de se rencontrer afin de définir les règles de segmentation a permis à notre groupe de faire beaucoup plus de progrès qu'il n'aurait été possible autrement. Ces rencontres ont également permis aux participants de plus de laboratoires de participer à l'effort d'harmonisation. Une première version du protocole a été achevée à Londres et est en cours de finalisation par l'intermédiaire de rendez-vous téléphoniques et de vidéoconférences.



Coups histologique et IRM de la partie antérieure de l'hippocampe. Image tirée de Olsen *et al.*, (2019). Progress update from the Hippocampal Subfields Group. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 13: 439-449.

## — Production scientifique et valorisation

Conférences :

- ▶ 2019 Society for Neuroscience, Chicago, USA.
- ▶ 2019 Organization for Human Brain Mapping, Rome, Italy.
- ▶ 2019 Alzheimer's Association International Conference, Los Angeles, USA.
- ▶ 2018 Society for Neuroscience, San Diego, USA.
- ▶ 2018 International Conference on Learning and Memory, Irvine, USA.
- ▶ 2018 Alzheimer's Association International Conference, Chicago, USA.
- ▶ 2017 Society for Neuroscience, Washington DC, USA.
- ▶ 2017 Alzheimer's Association International Conference, London, UK.

Publications :

- ▶ Olsen RK *et al.* (2019) Progress update from the Hippocampal Subfields Group. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 13: 439-449.
- ▶ Wisse LEM *et al.* (2017) *Hippocampus*. 27: 3-11
- ▶ Yushkevich PA *et al.* (2015) *NeuroImage*. 111: 526-41.

**Le projet HSG** est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en novembre 2016 et a duré 12 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 50 000 € (partenaire français).

**Partenaires** : 44 partenaires dont 4 participants français, et une équipe Française financée (Inserm U1077).

**COORDINATRICE**

**Rosanna Olsen**

Rotman Research Institute (Canada)

<http://hippocampalsubfields.com/>

# HuntAbeta

## Huntingtine et la régulation du trafic d'APP/Abeta dans la maladie d'Alzheimer

### — Rappel des objectifs

#### Comprendre le rôle du transport axonal d'APP dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par le trafic et le clivage anormaux de la protéine précurseur amyloïde (APP) dont la fonction est encore mal comprise. Comme APP est le pré-curseur des peptides A $\beta$  dont les niveaux sont cruciaux pour la MA, le clivage d'APP a été largement étudié. Cependant, on sait peu de choses sur la façon dont l'APP est transportée des corps cellulaires vers les synapses. En particulier, quels sont les mécanismes qui contrôlent le transport d'APP dans les axones et les dendrites ? Peut-on réduire la production d'A $\beta$  dans les modèles de la MA en modulant le transport d'APP ? Quels sont les impacts sur la production d'A $\beta$  et la maintenance des synapses ? Le but du projet est d'analyser en détail les régulateurs du transport axonal du trafic d'APP dans la MA. La dissection des mécanismes régulant le trafic d'APP peut conduire à une meilleure compréhension des mécanismes de production d'A $\beta$  et à de meilleures interventions thérapeutiques potentielles.

### — Résultats majeurs

#### Analyses *in vitro* et *in vivo* du transport axonal d'APP

En utilisant des dispositifs microfluidiques pour reconstituer sur puce un réseau corticocortical fonctionnel séparé par un compartiment synaptique, nous avons étudié le transport de l'APP dans les axones et les dendrites et l'accumulation d'A $\beta$  aux synapses. Nous avons pu montrer qu'APP est transporté vers les synapses à la fois par les neurones pré et post-synaptiques mais que la majorité de l'APP qui s'accumule à la synapse provient des neurones présynaptiques et que ce transport a lieu dans les axones. Nos travaux antérieurs ont montré que la huntingtine (HTT), la protéine qui est mutée dans la maladie de Huntington (MH) est capable de réguler le transport de la protéine APP. Nous avons identifié une forme non phosphorylée de la HTT qui réduit le transport de cargos. Nous avons alors testé la possibilité que cette forme HTT non phosphorylée puisse ralentir le transport d'APP vers la synapse. Nous avons pu montrer que lorsque la HTT n'est pas phosphorylée, le transport d'APP vers la synapse et son accumulation sont réduits. Nous avons alors observé que cette réduction du transport permet de réduire les conséquences d'une expression anormale de la protéine APP, situation qui est observée dans la MA. En effet, alors que l'expression anormale

d'APP conduit à une diminution du nombre de synapses, cette situation est restaurée lorsque la HTT n'est plus phosphorylée. Ces résultats suggèrent qu'un ralentissement du transport axonal d'APP pourrait avoir un effet physiologique sur la synapse et donc sur les défauts cognitifs observés dans la MA. Nous avons alors croisé des souris modèles de la MA avec des souris qui expriment la HTT non phosphorylable et dans lesquelles le transport antérograde de l'APP est réduit. Nous avons constaté que la diminution du transport axonal réduit les niveaux d'APP à la synapse et restaure le nombre de synapses *in vivo*. Nous avons ensuite analysé le comportement de ces souris et observé que la réduction chronique du transport axonal réduit le déficit de mémoire chez les souris modèles de la maladie. Nous n'avons pas trouvé de corrélation avec les niveaux d'A $\beta$  et de plaques amyloïdes dans le cerveau de ces souris suggérant que les défauts synaptiques et cognitifs sont plutôt liés au niveau synaptique d'APP mais pas à l'accumulation d'A $\beta$  et/ou de plaques amyloïdes. Ce projet a permis de mettre en évidence un lien entre les protéines HTT et APP qui sont respectivement responsables de la MH et de la MA. Ces travaux suggèrent qu'une meilleure compréhension du transport axonal d'APP pourrait permettre l'identification de stratégies thérapeutiques pour la MA.

### — Production scientifique et valorisation

► Bruyère J, Abada YS, Vitet H, Fontaine G, Deloulme JC, Cès A, Denarier E, Pernet-Gallay K, Andrieux A, Humbert S, Potier MC, Delatour B, Saudou F. Presynaptic APP levels and synaptic homeostasis are regulated by Akt phosphorylation of huntingtin. *Elife*. 2020 May 26;9:e56371. doi: 10.7554/eLife.56371.

Le projet **HuntAbeta** est un projet de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en octobre 2012 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 575 048 €.

Partenaires : CNRS UMR7225 / ICM.

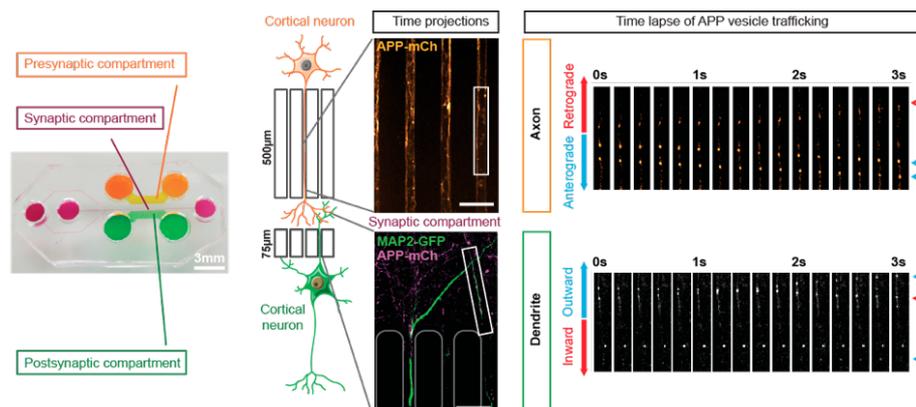
#### COORDINATEUR

Frédéric Saudou : frederic.saudou@inserm.fr

Institut Curie puis Inserm U836

<https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/en/research/research-teams/team-intracellular-dynamics-and-neurodegeneration>

Analyses du transport axonal et dendritique de la protéine APP en microchambre.  
Crédit : © F Saudou/J Bruyère.



## InVivoSTED

# Synaptic correlates of learning and memory dysfunction analyzed by super-resolution STED microscopy in the hippocampus *in vivo*

### — Rappel des objectifs

Les épines dendritiques constituent des unités de traitement informatique de l'information qui sous-tendent essentiellement toutes les fonctions cérébrales supérieures et jouent un rôle crucial dans les troubles cérébraux tels que l'autisme et la MA. Leur structure morphologique est étroitement liée à la fonction des synapses, car la taille des têtes des épines dendritiques s'adapte à la force synaptique, et la forme et le nombre des épines dendritiques peuvent être modifiés par l'induction de la plasticité synaptique et par l'expérience sensorielle.

Le « recâblage » des circuits neuronaux par la plasticité des épines dendritiques est considéré comme un mécanisme neurobiologique clé de la formation de la mémoire. Le rétrécissement des épines dendritiques potentialisées induit optiquement perturbe les capacités motrices nouvellement acquises. Alors que la plasticité des épines dendritiques associée à des expériences comportementales a été observée de façon constante dans le cortex de souris *in vivo*, on en sait très peu sur son rôle dans l'hippocampe, centre de mémoire du cerveau.

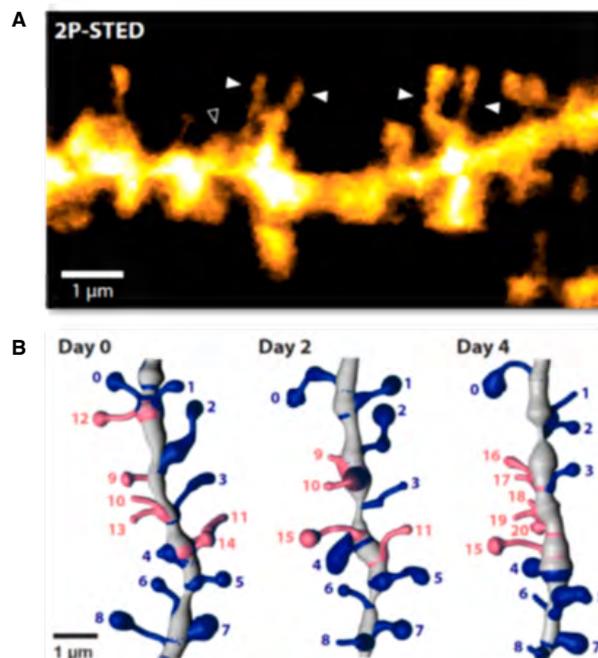
L'imagerie *in vivo* des épines dendritiques dans l'hippocampe est difficile en raison de son éloignement de plus de 1 mm sous la surface du cerveau de la souris. Une étude pionnière a permis d'y parvenir grâce à la microscopie de fluorescence bi-photonique (2P), mais seulement sur une période de quelques heures. Récemment, des approches basées sur une « fenêtre sur l'hippocampe » ou la micro-endoscopie ont permis l'imagerie 2P « chronique » sur plusieurs semaines. Cependant, la microscopie 2P manque inévitablement de la résolution spatiale nécessaire pour visualiser des détails importants de la morphologie des épines dendritiques et leur nombre.

### — Résultats majeurs

Nous nous sommes tournés vers la microscopie à super-résolution de type STED (STimulated Emission Depletion) pour améliorer la visualisation des épines dendritiques dans l'hippocampe intact de souris vivantes. Nous avons utilisé un microscope STED basé sur l'excitation 2P (2P-STED) et l'avons équipé d'un objectif à longue distance de travail pour atteindre l'hippocampe situé en profondeur. Nous avons adopté une technique de « fenêtre sur l'hippocampe », où une partie du cortex somatosensoriel sus-jacent est retirée chirurgicalement.

Cette nouvelle approche offre une résolution spatiale et une qualité d'image considérablement améliorées par rapport à la microscopie 2P dans l'hippocampe de la souris *in vivo*. En utilisant des souris transgéniques avec des neurones marqués par fluorescence, nous avons mesuré la densité des épines sur les dendrites des neurones dans l'hippocampe et comparé les résultats obtenus avec la microscopie 2P et 2P-STED *in vivo* ainsi qu'avec la microscopie STED dans des sections fixes de l'hippocampe. En outre, nous avons effectué des imageries *in vivo* 2P-STED répétitives sur une période de quatre jours pour mesurer le « turnover » des épines dendritiques.

La densité des épines est deux fois plus élevée que celle rapportée par la microscopie 2P, et environ 40 % de toutes les épines dendritiques se sont renouvelées dans les quatre jours, ce qui suggère un niveau élevé de remodelage des circuits dans l'hippocampe *in vivo*. Les petites épines sont principalement affectées par le renouvellement.



A : Image STED à super-résolution des épines dendritiques de l'hippocampe dans le cerveau d'une souris vivante. Les épines dendritiques forment des synapses excitatrices. Les modifications de leur nombre ou de leur forme constituent un mécanisme cellulaire clé pour le stockage des souvenirs dans le cerveau.  
B : Reconstruction anatomique d'une portion de dendrite qui a été imagée durant quatre jours.  
Crédit : © DR.

En résumé, le présent travail représente une avancée substantielle pour l'étude des synapses de l'hippocampe chez les souris vivantes, en étendant le champ d'application de la microscopie à super-résolution à une structure cérébrale profonde essentielle au fonctionnement de la mémoire.

### — Production scientifique et valorisation

► Pfeiffer T *et al.* *Elife*. 2018 Jun 22;7.

Le projet InVivoSTED est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mars 2016 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 211 578 €.

Partenaires : CNRS UMR 5297/Université de Bordeaux.

#### COORDINATEUR

Martin Fuhrmann  
DZNE Bonn (Allemagne)

#### CONTACT :

Daniel Choquet : daniel.choquet@u-bordeaux.fr  
<https://www.bordeaux-neurocampus.fr/team/dynamic-organization-and-function-of-synapses/>

# MAALAD

## Perturbation du cytosquelette dans la maladie d'Alzheimer : étude cellulaire et moléculaire

### — Rappel des objectifs

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par l'accumulation de deux types d'agrégats : des plaques extracellulaires contenant des peptides bêta-amyloïdes (A $\beta$ ) et des enchevêtrements neurofibrillaires intra-neuronaux composés de tau, une protéine associée aux microtubules. Si un consensus scientifique existe sur l'importance de ces deux marqueurs histologiques dans les mécanismes physiopathologiques à l'origine des altérations de la mémoire qui caractérisent cette pathologie, des interrogations perdurent sur les mécanismes impliquant ces protéines responsables des perturbations observées. Une étape importante dans la compréhension des modes d'action respectifs de la protéine tau et des formes solubles du peptide A $\beta$  est de déterminer comment ces deux acteurs de la maladie d'Alzheimer affectent les mécanismes moléculaires à l'origine des modifications fonctionnelles des réseaux neuronaux qui sous-tendent la mémoire. L'objectif du projet « MAALAD » était -1) de caractériser le rôle des cytosquelettes microtubulaire et d'actine des modifications morpho-fonctionnelles des synapses nécessaires à la mise en place des processus mnésiques -2) d'étudier les perturbations induites par ces deux acteurs majeurs de la maladie d'Alzheimer, les formes solubles pré-agrégées de la peptide bêta-amyloïde les oligomères solubles d' A $\beta$  et les différentes formes de la protéine tau (sauvage et mutées) afin de caractériser les perturbations fonctionnelles induites à l'échelle de la synapse.

### — Résultats majeurs

Nous avons pu démontrer que la réorganisation des cytosquelettes d'actine et microtubulaire neuronal est une étape essentielle des modifications morpho-fonctionnelles nécessaires à la mise en place des mécanismes moléculaires impliqués dans les processus mnésiques. Dans des conditions physiologiques, la protéine tau joue un rôle central dans cette réorganisation. En effet, elle régule non seulement l'organisation du cytosquelette neuronal microtubulaire mais elle présente également la capacité d'interagir et de réorganiser le cytosquelette d'actine présent dans les synapses des neurones impliqués dans la formation de la mémoire permettant ainsi la mise en place des modifications fonctionnelles nécessaires à l'établissement de la mémoire à l'échelle synaptique. Dans des conditions pathologiques telles que celles observées dans la maladie d'Alzheimer, le rôle de la protéine tau est perturbé avec comme conséquence une organisation des cytosquelettes neuronaux imparfaite qui ne permet plus la mise en place des mécanismes moléculaires nécessaires à la mémoire. Ces résultats nous ont amené à tester l'impact thérapeutique d'approches ciblant le rétablissement de la dynamique des cytosquelettes neuronaux dans les processus d'apprentissage dans la MA. Nous avons ainsi pu démontrer que des composés pharmacologiques ciblant des kinases agissant sur la dynamique des cytosquelettes microtubulaires ou d'actine rétablissent les propriétés dynamiques des cytosquelette synaptique et donc de l'apprentissage. En conclusion, dans le cadre du projet MAALAD nous avons identifié que dans des conditions pathologiques associées à la MA, il existait des altérations de l'organisation des cytosquelettes microtubulaire et d'actine qui produisent une incapacité de la mise en place des modifications morphologiques et fonctionnelles des synapses qui sous-tendent les processus mnésiques chez l'homme. Cette étude a validé l'intérêt thérapeutique des molécules ciblant le cytosquelette pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

### Tau : une protéine synaptique

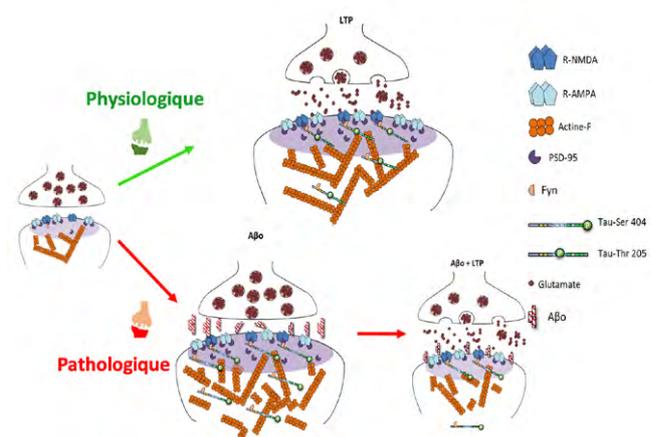


Fig : Schéma représentatif de l'implication des mécanismes moléculaires impliquant la protéine Tau et le peptide A $\beta$  dans le processus pathologiques observés au cours de la maladie d'Alzheimer. Crédit : © DR.

### — Production scientifique et valorisation

► 13 publications internationales sont issues de nos travaux effectués dans le cadre du projet MAALAD ; 2 brevets sont déposés ou en cours de dépôt.

**Le projet MAALAD** est un projet de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en octobre 2011 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 553 040 €.

**Partenaires :** I2MC (U1216 - INSERM), Grenoble Institut des Neurosciences.

#### COORDINATEUR

**Alain Buisson :** [alain.buisson@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:alain.buisson@univ-grenoble-alpes.fr)

Inserm U836 Grenoble Institut des Neurosciences

<https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/fr/recherche/>

[equipes-de-recherche/equipe-neuropathologies-et-dysfonctionnements-synaptiques--637939.htm?RH=NEUROFR\\_ANNU](https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/fr/recherche/equipes-de-recherche/equipe-neuropathologies-et-dysfonctionnements-synaptiques--637939.htm?RH=NEUROFR_ANNU)

## MetAlZ

## Origines cellulaires des déficits métaboliques dans la maladie d'Alzheimer

## — Rappel des objectifs

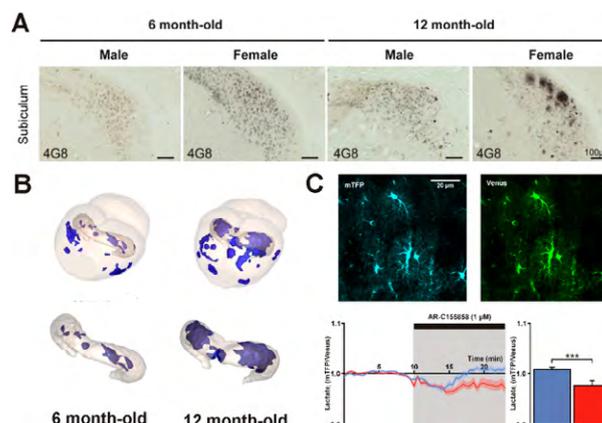
Un des enjeux majeurs dans la recherche de traitements efficaces contre la maladie d'Alzheimer (MA) est de la diagnostiquer le plus tôt possible afin d'intervenir avant que les dommages ne soient irréversibles. Les déficits du métabolisme cérébral se sont révélés être un indicateur présymptomatique fiable de l'évolution de la maladie. Le métabolisme étant essentiel aux fonctions cérébrales et à l'intégrité du cerveau, ses altérations pourraient initier ou contribuer aux processus neurodégénératifs irréversibles de la MA. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces déficits pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir la progression de la MA. Notre but est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'hypométabolisme cérébral de la MA. Pour atteindre cet objectif nous avons conçu une approche descendante visant à i) définir les régions cérébrales présentant les premiers signes anatomopathologiques et métaboliques de la maladie, ii) caractériser les altérations phénotypiques de plusieurs types cellulaires suspectés et iii) déterminer avec une haute résolution spatiale et temporelle les changements d'activités métaboliques des types cellulaires suspectés.

## — Résultats majeurs

L'anatomopathologie des signes de la MA s'est révélée être plus marquée et plus précoce chez les souris 3xTg femelles que chez les mâles. Le subiculum est en outre l'une des premières structures cérébrales à développer des plaques amyloïdes et des déficits métaboliques.

A un stade juvénile, les cellules pyramidales corticales des souris 3xTg présentent une hyperactivité glycolytique et un déficit de la voie des pentoses phosphates sans toutefois présenter d'autres altérations phénotypiques notoires. Le métabolisme du glucose étant important à la survie neuronale, ces altérations pourraient contribuer aux dysfonctionnements plus tardifs des cellules pyramidales au cours de la MA.

La voie astrocytaire de synthèse de L-Sérine, qui se branche sur la glycolyse, est altérée chez les souris 3xTg jeunes ainsi que chez des patients atteints de la MA. Cette altération métabolique se traduit par un déficit en D-Sérine, un co-agoniste des récepteurs NMDA nécessaire à la plasticité synaptique, ainsi que par des déficits synaptiques et comportementaux. Ces déficits sont mimés par une inactivation de la voie astrocytaire de synthèse de L-Sérine. Un régime alimentaire enrichi en L-Sérine permet de prévenir les déficits synaptiques et comportementaux des souris 3xTg. Ces résultats montrent que la glycolyse astrocytaire contrôle les fonctions cognitive et suggèrent que la L-sérine orale est un traitement de la MA déjà disponible.



Anatomopathologie et déficits métaboliques progressifs chez les souris 3xTg-AD. La pathologie amyloïde apparaît dans le subiculum et est plus marquée chez les femelles que chez les mâles (A). L'hypométabolisme (régions bleues) s'observe essentiellement dans la formation hippocampique des souris femelles dès 6 mois et s'étend à 12 mois (B). L'imagerie du lactate intracellulaire en utilisant le biosenseur FRET Laconic révèle un déficit de glycolyse dans les astrocytes hippocampiques (C, bleu ; souris sauvage, rouge ; souris 3xTg-AD). Figure issue de l'article Le Douce *et al.* Impairment of glycolysis-derived L-serine production in astrocytes contributes to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Cell Metab* 2020, Mar 3;31(3):503-517.

## — Production scientifique et valorisation

Publications :

- Merienne *et al.* Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. *F1000Res*. 2013 Jul 5;7:106.
- Bonvento *et al.* Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases. *JCBFM*. 2017 Jun;37(6):1927-1943.
- Piquet *et al.* Supragranular Pyramidal Cells Exhibit Early Metabolic Alterations in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *F1000Res*. 2018 Jul 18;12:216.
- Devienne *et al.* Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After Patch-clamp. *JoVE*. 2018 Jun 20;(136).
- Le Douce *et al.* Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab*. 2020 Mar 3;31(3):503-517.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.004.

Mise en place d'une plateforme d'imagerie pour l'étude longitudinale du métabolisme cérébral par bioluminescence (contrat FRC).

**Le projet MetAlZ** est un projet de recherche fondamentale et pré-clinique. Le projet a commencé en novembre 2011 et a duré 51 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 435 922 €.

**Partenaires :** Laboratoire CEA URA 2210 (CNRS).

**COORDINATEUR**

**Bruno Cauli** : bruno.cauli@upmc.fr  
CNRS UMR 8246 (SU, INSERM)

# MinAlpha7

## Imagerie moléculaire des récepteurs nicotiques alpha7 dans la maladie d'Alzheimer

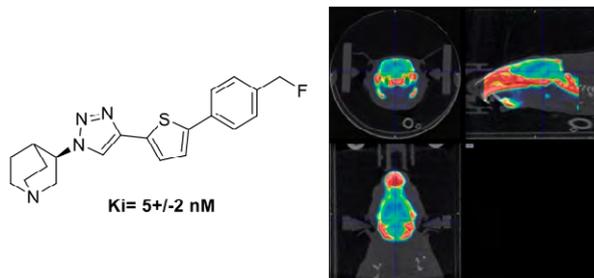
### — Rappel des objectifs

L'imagerie moléculaire en tomographie d'émission de positons (TEP), utilise des traceurs radioactifs ou radiopharmaceutiques, et permet l'exploration de fonctions biologiques dans l'organisme vivant. Cette méthode peut ainsi détecter des lésions cérébrales apparaissant au cours de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA), elle est donc une technique de choix pour le diagnostic précoce et le suivi de l'efficacité des traitements. Le diagnostic de certitude de la MA repose sur la mise en évidence post mortem de lésions cérébrales caractéristiques telles que des dépôts de protéines  $\beta$ -amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires. Depuis peu, ces lésions peuvent être explorées en TEP mais leur densité ne semble pas toujours refléter l'intensité du déclin cognitif. L'objectif général du projet vise au développement de nouveaux traceurs permettant l'exploration en TEP des systèmes de neurotransmission cholinergiques connus pour être affectés dans la MA. Les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine de type alpha7 (R $\alpha$ 7) sont une cible de choix car : 1) ils sont très exprimés dans les régions cérébrales touchées (hippocampe, cortex) et leur diminution précoce est corrélée avec la perte des fonctions cognitives; 2) ils favorisent l'internalisation du peptide A $\beta$ , augmentant ainsi sa neurotoxicité; 3) ils stimulent des voies de signalisation capables de prévenir la réaction inflammatoire très impliquée dans la MA, et leurs agonistes sont considérés comme de potentiels neuroprotecteurs. Le projet MinAlpha7 proposait de développer un traceur dédié à l'exploration des R $\alpha$ 7, car au moment du dépôt de ce projet aucun traceur TEP marqué au fluor-18 permettant d'explorer ces récepteurs n'était disponible en clinique.

### — Résultats majeurs

Le développement de nouveaux traceurs utilisables en TEP repose sur une démarche expérimentale multidisciplinaire allant de la chimie à la clinique en passant par la radiochimie et les modèles animaux. Elle comporte les étapes suivantes: 1) conception et synthèse chimique de nouveaux composés, 2) validation pharmacologique in vitro (affinité, spécificité), 3) marquage au  $^{18}\text{F}$  des composés d'intérêt, 4) évaluation de ces nouveaux traceurs candidats in vivo chez l'animal (passage de la BHE, cinétique, métabolisme, quantification), 5) études pilotes avant utilisation en clinique (toxicité, dosimétrie, cinétique, métabolisme). Le projet MinAlpha7 inclut les 4 premières étapes.

Au total, environ 180 nouveaux composés ont été synthétisés et évalués pour leur affinité vis à vis des R $\alpha$ 7. Parmi eux, 6 possédaient une bonne affinité et un atome de fluor pouvant être substitué par un  $^{18}\text{F}$ . Ces 6 composés ont été radiomarqués et évalués in vivo chez le rat. Ces travaux ont été poursuivis grâce à un financement de la région Centre-Val de Loire. Nous avons comparé les propriétés biologiques des traceurs TEP issus de nos travaux à celles d'un traceur décrit au cours de la même période, le [ $^{18}\text{F}$ ]ASEM, dont nous avons mis au point la préparation sur site. Celui-ci ayant les meilleures propriétés en termes de liaison aux R $\alpha$ 7 in vivo chez le rongeur, nous l'avons utilisé pour poursuivre nos travaux dans des modèles animaux d'affections neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson).



Composé « OA545 » : formule chimique, affinité pour les R $\alpha$ 7 (K $_i$ ), images TEP de l'accumulation cérébrale chez le rat. Crédit : © DR.

### — Production scientifique et valorisation

Nos travaux ont été valorisés par la publication de 4 articles dans des journaux internationaux à comité de lecture, et 1 brevet international :

- ▶ Ouach, A., Vercouillie, J., Bertrand, E., Rodrigues, N., Pin, F., Sérière, S., Boyirana, L., Chartier, A., Percina, N., Tangpong, P., Gulhan, Z., Mothes, C., Deloye, J.B., Guilloteau, D., Page, G., Suzenet, F., Buron, F., Chalon\*, S., Routier\*, S. (\*equal contribution) (2019) Bis(het)aryl-1,2,3-triazole as  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor ligands : synthesis, structure affinity relationships, agonism activity, [ $^{18}\text{F}$ ]-radiolabeling and PET study in rats *Eur J Med Chem* 179:449-469.
- ▶ Ouach, A., Pin, F., Bertrand, E., Vercouillie, J., Gulhan, Z., Mothes, C., Deloye, J.B., Guilloteau, D., Suzenet, F., Chalon, S., Routier, S. (2016) Design of  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor ligand using the (het)Aryl-1,2,3-triazole core: Synthesis, in vitro evaluation and SAR studies. *Eur J Med Chem* 107:153-64.
- ▶ Chalon, S., Vercouillie, J., Guilloteau, D., Suzenet, F., Routier, S. (2015) PET tracers for imaging brain  $\alpha$ 7 nicotinic receptors: an update. *Chem Comm* DOI: 10.1039/c5cc04536c.
- ▶ Pin, F., Vercouillie, J., Ouach, A., Mavel, Gulhan, Z., Chicheri, G., Jarry, C., Massip, S., Deloye, J.-B., Guilloteau, D., Suzenet, F., Chalon\*, S., Routier\*, S. (\*equal contribution) (2014) Design of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor ligands in quinuclidine, tropane and quinazoline series. Chemistry, molecular modeling, radiochemistry, in vitro and in rats evaluations of a [ $^{18}\text{F}$ ] quinuclidine derivative. *Eur J Med Chem* 82:214-224.
- ▶ S. Routier, F. Suzenet, F. Pin, S. Chalon, J. Vercouillie, D. Guilloteau. (2012) New 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole compounds are alpha-7 nicotinic receptor modulators, useful for treating CNS diseases, anxiety, cognitive disorder, hyperactivity, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *WO2012143526*.

**Le projet MinAlpha7 est un projet de recherche fondamentale et préclinique. Le projet a commencé en février 2011 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 354 662 €.**

**Partenaires :** UMR CNRS7311, ICOA, Orléans.

#### COORDINATRICE

**Sylvie Chalon** : [sylvie.chalon@univ-tours.fr](mailto:sylvie.chalon@univ-tours.fr)  
UMR Inserm U1253, iBrain, Tours  
<https://ibrain.univ-tours.fr/>

# NeurobioPKR

## PKR et molécules de danger dans la maladie d'Alzheimer

### — Rappel des objectifs

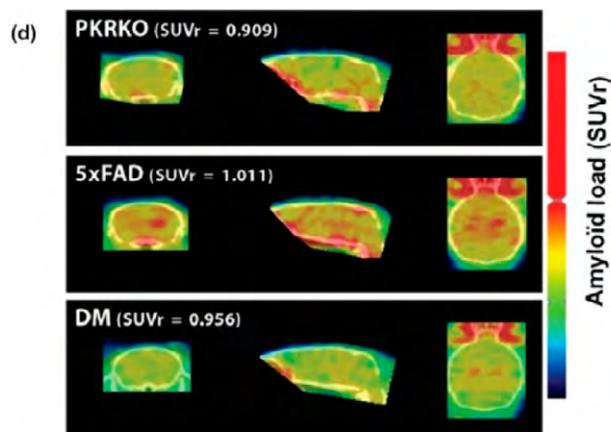
La maladie d'Alzheimer (MA) est marquée sur le plan clinique par des troubles mnésiques suivis progressivement par une aphasia, une apraxie et une agnosie. Les lésions neuropathologiques regroupent une accumulation de peptide beta amyloïde sous formes de plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires constituées de protéine tau hyper phosphorylée. Il s'associe à ces lésions, une neuroinflammation et des pertes synaptiques et neuronales. La cause de la MA n'est pas connue mais selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, les oligomères de peptide amyloïde 1-42 serait neurotoxiques et entraîneraient des anomalies neuronales et gliales conduisant à l'accumulation de tau phosphorylée, à l'inflammation et à la neurodégénérescence. Nous avons montré antérieurement que la kinase pro-apoptotique avait des concentrations élevées dans le cerveau des patients MA et des niveaux augmentés dans le LCS de patients avec troubles cognitifs légers et de patients MA. La kinase PKR participe à l'« integrated stress response » en bloquant la traduction cellulaire par phosphorylation d'eIF2 alpha et elle est aussi impliquée dans la production de cytokines inflammatoires et dans l'inflammasome. Nous avons aussi montré chez nos patients que les concentrations de PKR et PKR phosphorylée du LCS étaient un facteur de prédiction du déclin cognitif chez les patients avec des troubles cognitifs légers et les patients MA. Le but de l'étude est de comprendre si la kinase PKR peut-être en partie à l'origine de la neuroinflammation cérébrale de la MA en activant le toll-like récepteurs des molécules de danger.

### — Résultats majeurs

- Nous avons montré que l'inflammation périphérique expérimentale induite par le LPS produisait une neuroinflammation avec augmentation de la production de peptide amyloïde 1-42. Si ces injections de LPS sont effectuées chez des souris PKR knock out, on note une diminution de la neuroinflammation centrale et une diminution de la production de peptide amyloïde 1-42. PKR participerait à l'inflammasome et l'amylose cérébrale (Carret Rebillat *et al.* Et Hugon *et al.*)

- Nous avons montré que l'interaction protéine PACT qui est l'activateur de PKR et son substrat peut engendrer une diminution des conséquences inflammatoires liées à l'activation de PKR (Dabo *et al.*)

- Enfin le croisement de souris transgéniques Alzheimer 5XFAD avec des souris Knock out PKR entraine une réduction du déclin mnésique et cognitif chez les souris double mutante, une diminution de la charge amylose cérébrale, une diminution de la neuroinflammation et de l'apoptose cellulaire cérébrale. Des études en co-cultures cellulaires neurones/microglie ont révélées que c'était le PKR neuronal qui jouait un rôle majeur dans la neurodégénérescence après exposition des cultures au LPS. PKR est donc un acteur de la neurodégénérescence, de l'amyloïdose cérébrale et du déclin cognitif observé.



Réduction de la charge amyloïde en PET amyloïde (florbetapir) chez les souris double mutante (DM) 5XFAD :PKRKO par rapport aux souris Alzheimer pure 5XFAD (Tible *et al.* 2019).

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ PKR knockout in the 5XFAD model of Alzheimer's disease reveals beneficial effects on spatial memory and brain lesions. Tible M, Mouton Liger F, Schmitt J, Giralt A, Farid K, Thomasseau S, Gourmaud S, Paquet C, Rondi Reig L, Meurs E, Girault JA, Hugon J. *Aging Cell.* 2019 Jun;18(3):e12887. doi: 10.1111/ace1.12887.
- ▶ Inhibition of the inflammatory response to stress by targeting interaction between PKR and its cellular activator PACT. Dabo S, Maillard P, Collados Rodriguez M, Hansen MD, Mazouz S, Bigot DJ, Tible M, Janvier G, Helynck O, Cassonnet P, Jacob Y, Bellalou J, Gatignol A, Patel RC, Hugon J, Munier-Lehmann H, Meurs EF. *Sci Rep.* 2017 Nov 23;7(1):16129. doi: 10.1038/s41598-017-16089-8.
- ▶ PKR involvement in Alzheimer's disease. Hugon J, Mouton-Liger F, Dumurgier J, Paquet C. *Alzheimers Res Ther.* 2017 Oct 5;9(1):83. doi: 10.1186/s13195-017-0308-0
- ▶ Neuroinflammation and Aβ accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation. Carret-Rebillat AS, Pace C, Gourmaud S, Ravasi L, Montagne-Stora S, Longueville S, Tible M, Sudol E, Chang RC, Paquet C, Mouton-Liger F, Hugon J. *Sci Rep.* 2015 Feb 17;5:8489. doi: 10.1038/srep08489.

**Le projet NeurobioPKR** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2013 et a duré 52 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 708 000 €.

**Partenaires :** Inserm UMRS 839, Université Paris Diderot UMR 941, UPMC UMR 7102, CNRS/Institut Pasteur Hepacivirus unit.

#### COORDINATEUR

**Jacques Hugon** : jacques.hugon@aphp.fr, jacques.hugon@inserm.fr - Inserm, Institut du Fer à Moulin  
www.cmrr.parisnord.org

## P2X7RAD

# Rôle du récepteur purinergique P2X7 dans la maladie d'Alzheimer

### — Rappel des objectifs

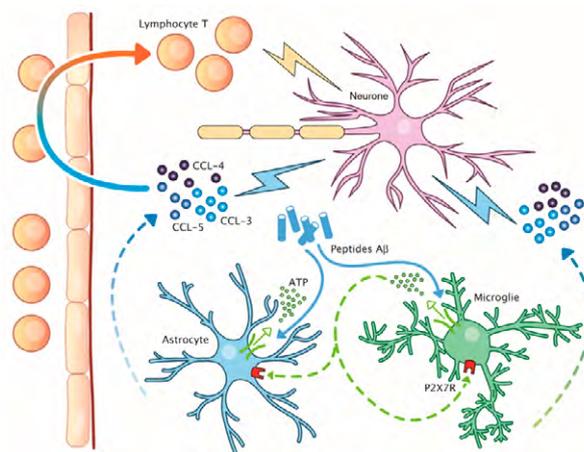
La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative liée à l'âge qui se caractérise par des pertes des fonctions cognitives avec au premier plan une atteinte mnésique. Actuellement, il n'y a aucun traitement qui retarde ou arrête la progression de la maladie. La plupart des approches thérapeutiques pour traiter la MA sont axées sur les mécanismes conduisant à la formation des deux lésions caractéristiques de la pathologie : les plaques séniles composées d'agrégats extracellulaires de peptides amyloïdes  $\beta$  ( $A\beta$ ) et les dégénérescences neurofibrillaires constituées d'agrégats intracellulaires de protéines tau hyperphosphorylées. Les processus inflammatoires et immunologiques jouent un rôle important dans cette maladie : le système immunitaire participerait à la destruction des plaques d' $A\beta$  mais aussi à la production de molécules pro-inflammatoires qui sont délétères pour les neurones. Ainsi, les nouvelles perspectives thérapeutiques visent à contrôler cette réponse immunitaire dans la MA.

### — Résultats majeurs

La MA touche principalement des sujets âgés dont le système immunitaire pourrait s'avérer déficient chez les patients atteints de MA. En comparant l'effet du vieillissement et l'effet de la pathologie sur l'activation du système immunitaire dans un modèle murin, nous avons mis en évidence que la principale différence réside dans une production beaucoup plus importante de molécules pro-inflammatoires, notamment les chimiokines, dans le cas de la pathologie. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques qui consisteraient à adapter la réponse immunitaire pour réduire cette réponse pro-inflammatoire.

Parmi les cibles thérapeutiques potentielles, le récepteur P2X7 (P2X7R) pourrait être impliqué dans le développement et la progression de la MA car il contribue au développement des réponses inflammatoires. Son expression est augmentée dans les cellules gliales qui entourent les plaques  $A\beta$  dans des modèles animaux et chez les patients atteints de MA. P2X7R est activé en présence de forte concentration d'ATP, libérée par les cellules endommagées et qui agit comme un signal de danger. Un double rôle de ce récepteur, à la fois pro-inflammatoire et neuro-protecteur, a été supposé dans la MA. Nous avons cherché à mieux comprendre son implication dans cette pathologie. Pour cela, nous avons étudié les conséquences de l'inactivation de P2X7R dans un modèle murin de MA. Nous avons montré que l'absence de P2X7R réduisait non seulement les lésions  $A\beta$ , mais également les déficits cognitifs associés. Nous avons démontré que P2X7R est une cible thérapeutique pertinente en empêchant la production de chimiokines pro-inflammatoires et le recrutement de lymphocytes T pathogènes.

L'ensemble de ces résultats apportent de nouveaux éléments importants sur l'implication du système immunitaire dans la MA et ouvre de nouvelles pistes de recherche sur le potentiel des antagonistes du P2X7R en tant que cible thérapeutique dans la MA.



Rôle du récepteur purinergique P2X7 dans la pathologie  $A\beta$  (adapté de Médecine Sciences Martin E *et al.* 2018).

Les peptides  $A\beta$  induisent la libération d'ATP par les cellules gliales qui peuvent à leur tour libérer de l'ATP via l'activation de récepteurs purinergiques. Cette augmentation d'ATP extracellulaire active P2X7R, entraînant la libération des chimiokines CCL (C-C motif chemokine ligand) 3, 4 et 5 par la microglie et les astrocytes. Ces chimiokines pourraient entraîner directement une atteinte des fonctions neuronales et conduiraient au recrutement de lymphocytes T dans le système nerveux central, en particulier les lymphocytes T CD8+, qui participeraient également à la toxicité neuronale.

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Martin E, *et al.* Mol Psychiatry. 2019 Jan;24(1):108-125.
- ▶ Martin E, *et al.* Aging Cell. 2017 Feb;16(1):27-38.
- ▶ Laurent C, *et al.* Brain. 2017 Jan;140(Pt 1):184-200.
- ▶ Martin E, *et al.* J Vis Exp. 2017 Jun 22;(124).
- ▶ Kanellopoulos J & Delarasse C. Front Cell Neurosci. 2019 Sep 4;13:401.
- ▶ Martin E & Delarasse C. Biomed J. 2018 Feb;41(1):34-40
- ▶ Martin E, *et al.* Med Sci (Paris). 2019 Feb;35(2):97-99.
- ▶ Laurent C, *et al.* Med Sci (Paris). 2017 Oct;33(10):817-819.

**Le projet P2X7RAD** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en février 2013 et a duré 59 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 533 000 €.

**Partenaires** : AP-HP (INSERM), ICM (Paris), CNRS UMR 7225, Université Paris Sud UMR 8619, Univ Paris Sud.

#### COORDINATEUR

**Bertrand Fontaine** : [bernard.fontaine@sorbonne-universite.fr](mailto:bernard.fontaine@sorbonne-universite.fr)  
Inserm UMR\_S974

## PERADES

## Deciphering genetic, Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease using powerful cohorts, focused Epigenetics and Stem cell metabolomics

## — Rappel des objectifs

Au-delà des formes autosomiques dominantes rares de la MA (moins de 1 %), les formes communes de la pathologie ont une composante génétique importante, estimée à environ 70 %. Ainsi, déchiffrer cette composante génétique offre une opportunité unique pour (i) mieux définir l'étiologie sous-jacente de la MA ; et (ii) de définir des scores de risque polygéniques potentiellement utiles en terme d'outils diagnostiques/pronostiques.

C'est dans ce contexte que le consortium PERADES a été mis en place afin de caractériser de nouveaux déterminants génétiques de la MA et de déterminer si ces déterminants peuvent être utiles en terme d'outil diagnostique et finalement de rechercher des interactions possibles entre gènes et facteurs environnementaux.

## — Résultats majeurs

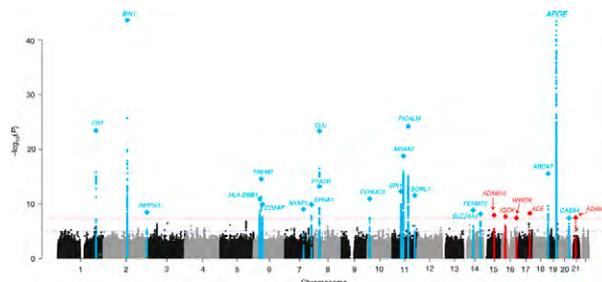
Grâce à l'utilisation d'un nouvel outil de génotypage appelé « Exome chip » qui permet d'analyser de nombreux variants non-synonymes, ce travail a permis de confirmer le gène TREM2 comme déterminant génétique majeur de la MA mais aussi de mettre en évidence deux nouveaux facteurs génétiques, ABI3 et PPLCY2. De façon importante, ces trois gènes sont principalement exprimés dans les cellules microgliales, indiquant un rôle majeur de la réponse inflammatoire dans la MA.

Le projet PERADES a aussi participé à la ré-analyse de la base de données IGAP (International Genomics of Alzheimer Project). Après réplication, 5 nouveaux signaux atteignant le seuil de significativité GWAS ont été caractérisés.

Le projet s'est aussi focalisé sur des formes extrêmes (âge de début précoce avant 65 ans). Des analyses d'exomes ont été réalisés par le Centre National de Génotypage (Évry) sur 830 patients (dont 400 financés par PERADES) et 1 200 contrôles appariés. L'association de 2 gènes (TREM2 et ABCA7) a été confirmée et un troisième gène (SORL1) pour lequel un ensemble de variants tronquants ou faux sens rares confère un risque important de MA a été identifié. L'existence d'un excès de mutations de novo sur plusieurs gènes d'un réseau fonctionnel centré sur le peptide amyloïde a été montré. Enfin, l'analyse de CNVs a démontré que des duplications du gène MAPT causaient une maladie neurodégénérative nouvelle, dont les liens avec la MA sont maintenant à préciser.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Kunkle, B. *et al.* Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet.* 2019 Mar;51(3):414-430.
- ▶ Sims, R. *et al.* Rare coding variants in PLAGL2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2017 Sep;49(9):1373-1384.
- ▶ Nicolas G, Charbonnier C, Oliveira J.R.M. Improving Significance in Association Studies: a New Perspective for Association Studies. *THE JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE* 2015, 56: 529-530.
- ▶ Rovelet-Lecrux A *et al.* De novo deleterious genetic variations target a biological network centered on A $\beta$  peptide in early-onset Alzheimer disease. *MOLECULAR PSYCHIATRY* 2015, 20: 1046-1056.
- ▶ Nicolas G *et al.* Screening of dementia genes by whole-exome sequencing in early-onset Alzheimer disease: input and lessons. *EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS* 2016, 24: 710-716.



Manhattan plot décrivant les loci associés au risque de développer la maladie d'Alzheimer (en bleu, ceux déjà connus et en rouge ceux nouvellement caractérisés). Crédit : © Kunkle *et al.*, *Nat Genet.* 2019.

- ▶ Nicolas G *et al.* SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer's disease. *MOLECULAR PSYCHIATRY* 2016, 21:831-836.
- ▶ Le Guennec K *et al.* ABCA7 rare variants and Alzheimer disease risk. *NEUROLOGY* 2016, 86: 2134-2137.
- ▶ Campion D *et al.* Alzheimer disease: modeling an A $\beta$ -centered biological network. *MOLECULAR PSYCHIATRY* 2016, 21: 861-871.
- ▶ Le Guennec K *et al.* 17q21.31 duplication causes prominent Tau-related Dementia with Increased MAPT Expression. *MOLECULAR PSYCHIATRY* 2016, Dec 13. doi: 10.1038/mp.2016.226. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27956742.
- ▶ Le Guennec K *et al.* Deletion of exons 9 and 10 of the Presenilin 1 gene in a patient with Early-onset Alzheimer Disease generates longer amyloid seeds. *NEUROBIOLOGY OF DISEASE* 2017 Apr 28. pii: S0969-9961(17)30102-X. doi: 10.1016/j.nbd.2017.04.020. [Epub ahead of print]
- ▶ Lanoiselée HM *et al.* APP, PSEN1 and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A study of 170 families and 119 sporadic cases. *PLOS MEDICINE* 2017, 14: e1002270.
- ▶ Bellenguez C *et al.* Contribution to Alzheimer's disease risk of rare variants in TREM2, SORL1, and ABCA7 in 1779 cases and 1273 controls. *NEUROBIOLOGY OF AGING* 2017, 59: 220.e1-220.e9.
- ▶ Campion D, Charbonnier C, Nicolas G. SORL1 genetic variants and Alzheimer disease risk: a literature review and meta-analysis of sequencing data. *ACTA NEUROPATHOL.* 2019 Aug;138(2):173-186.

**Le projet PERADES** est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mai 2014 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 758 960 €.

**Partenaires :** Erasmus Medical Center Rotterdam (Pays-Bas), VU University Medical Center Amsterdam (Pays-Bas), UCL Institut Pasteur de Lille U744, Inserm U1079.

**COORDINATRICE**

**Julie Williams**

Université de Cardiff (Royaume-Uni)

**CONTACTS :**

Dominique Campion : dominique.campion@univ-rouen.fr

Jean-Charles Lambert : jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr

## PREVENTAD

# MMP-12 comme marqueur précoce et cible thérapeutique dans la progression de la maladie d'Alzheimer

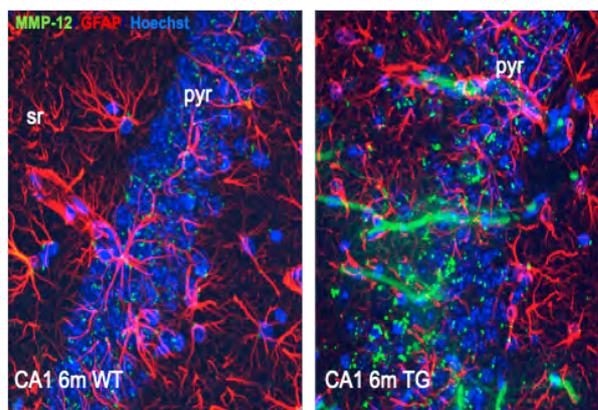
### — Rappel des objectifs

#### Évaluation du rôle de MMP-12 dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative pour laquelle il n'existe que des traitements palliatifs avec des bénéfices marginaux. La MA est caractérisée par l'accumulation d'enchevêtrements neurofibrillaires et la formation de plaques amyloïdes et est associée à un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et à des processus neuroinflammatoires. Nous avons montré, ainsi que d'autres groupes, que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) contribuent à la neuroinflammation et à la neurodégénérescence et modulent les propriétés de la BHE. MMP-12 est une protéinase associée aux processus inflammatoires, encore peu étudiée dans le cerveau. L'objectif général de notre projet était de générer des connaissances sur le rôle de MMP-12 cérébrale au niveau vasculaire et d'évaluer si MMP-12 est un marqueur précoce et/ou une cible thérapeutique dans la MA, en synergie avec d'autres MMPs. Le projet était multidisciplinaire, impliquant la chimie, la biochimie, la pharmacologie, la biologie moléculaire et cellulaire, l'imagerie cellulaire et les approches comportementales chez l'animal. Nous avons ainsi combiné des études *in vitro* sur des cultures primaires de cellules gliales et neuronales et des modèles *in vitro* de la BHE, et des études *in vivo* sur les modèles de souris transgéniques 5xFAD de la MA pour étudier le rôle de MMP-12 dans le clivage de l'APP, la neuroinflammation, le comportement. En particulier, nous avons généré de nouvelles souches de souris bigéniques (5xFAD/MMP-12<sup>-/-</sup> et 5xFAD/MT5-MMP<sup>-/-</sup>) en croisant les souris 5xFAD avec des souches de souris déficientes en MMP-12 et MT5-MMP. Des méthodologies similaires ont été appliquées en parallèle pour une étude comparative de MMP-12, MT1-MMP et de MT5-MMP, potentiellement impliquées dans la MA.

### — Résultats majeurs

Nous montrons que l'expression de MMP-12 augmente avec le vieillissement, en phase avec l'augmentation des taux de marqueurs d'inflammation. Nous montrons également une forte induction de MMP-12, dans des modèles *in vitro* de BHE enflammée. L'application de MMP-12 recombinante à ce modèle conduit à une perméabilité accrue de la BHE *in vitro*, associée à la protéolyse de constituants des jonctions serrées impliquées dans l'intégrité de la BHE. Cependant, MMP-12 semble moins impliquée dans le clivage de l'APP que MT1-MMP et MT5-MMP. Nous montrons que l'expression de MMP-12 augmente chez les souris 5xFAD à un stade précoce de la maladie, et progresse au cours du vieillissement avec les processus neuroinflammatoires. Le rôle de MMP-12 dans la MA a été étudié dans la lignée de souris bigénique 5xFAD déficiente pour MMP-12 que nous avons générée, et nous montrons qu'*in vivo*, MMP-12 serait effectivement impliquée dans les altérations de la BHE. Les études menées en parallèle indiquent que MT1-MMP et MT5-MMP seraient plus impliquées dans le clivage de l'APP que MMP-12. D'une manière générale, nos résultats suggèrent que parmi les MMP impliquées dans la MA, l'expression de MMP-12 est un marqueur précoce de l'inflammation qui serait liée à une altération vasculaire au cours du vieillissement et dans la MA.



Photographies de coupes de cerveaux réalisées chez des souris sauvages (WT) et des souris transgéniques (TG) modèles de la maladie d'Alzheimer à 6 mois. Les neurones pyramidaux (pyr) de la couche CA1 de l'hippocampe, une structure cérébrale atteinte dans la pathologie, sont colorés en bleu au niveau de leurs noyaux. Les astrocytes, les cellules de soutien des neurones sont marquées en vert. La distribution de MMP-12 active, révélée avec la sonde fluorescente RXP470, est en rouge. Cette sonde montre une nette augmentation de l'activité de MMP-12 dans le système vasculaire cérébral des souris Alzheimer comparé aux souris WT. Crédit : © DR.

### — Production scientifique et valorisation

Le projet a permis la publication de 14 articles dans des revues internationales et le dépôt de 2 brevets. Les résultats du projet ont été présentés lors de 18 réunions nationales et internationales. Une thèse de doctorat (Amandine Bonnet) a également été réalisée et soutenue en janvier 2017 sur le projet MMP-12, MT5-MMP, MT1-MMP dans la MA.

**Le projet PREVENTAD** est un projet collaboratif public-privé de recherche fondamentale. Le projet a commencé en novembre 2011 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 501 674 €.

**Partenaires :** Société Vect-Horus (Marseille) ; Simopro, CEA.

#### COORDINATEUR

**Michel Khrestchatsky :** michel.khrestchatsky@univ-amu.fr  
Aix-Marseille Université, NICN  
<https://inp.univ-amu.fr>

## SPREADTAU

## Transfert différentiel intercellulaire des assemblages de Tau

## — Rappel des objectifs

Les tauopathies sont des maladies caractérisées par une agrégation des protéines Tau menant à la dégénérescence neuronale. Tau est présente dans le cerveau sain sous six isoformes et un déséquilibre de ce ratio est observé en contexte pathologique. Dans certaines tauopathies sporadiques, dont la MA, cette dégénérescence évolue dans le cerveau en suivant un chemin spatiotemporel bien caractérisé. Cette évolution est le résultat d'une propagation inter-cellulaire de la protéine Tau via un possible mécanisme de type prion. L'objectif de SPREADTAU est de définir la place des différentes isoformes de Tau dans la propagation de la pathologie. Une étude comparative sans a priori des six isoformes de Tau fut réalisée afin d'évaluer la toxicité, l'internalisation, l'agrégation de type Prion (seeding) et enfin la propagation de ces espèces.

## — Résultats majeurs

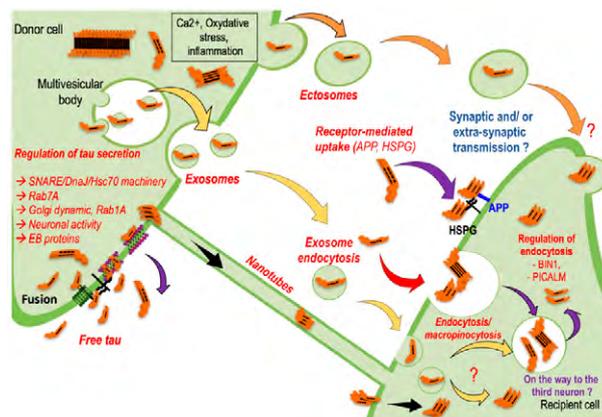
Combinant les expériences sur les mécanismes d'agrégation et propagation de l'alpha-synucléine et de tau, SPREADTAU a exploré l'homéostasie cérébrale (cholestérol, inflammation) et leurs conséquences sur la sécrétion et la propagation de la pathologie tau.

Ce projet a mis en évidence un nouveau mode de transfert de Tau par les nanotubes. Nous avons aussi documenté le processus d'internalisation des assemblages pathogéniques de l'alpha-synucléine, de tau et de la Huntingtine Exon1 par les cellules et la voie par laquelle ces assemblages atteignent le cytoplasme où ils croissent par recrutement de leurs protéines constituantes sous forme monomérique dans le cytoplasme. Nous avons ainsi montré que les assemblages d'alpha-synucléine sont internalisés par endocytose. Ils sont ensuite dirigés vers le lysosome. C'est lors de la fusion des endosomes avec le compartiment lysosomal qu'une fraction des assemblages s'échappe des compartiments membranaires, se retrouve dans le cytoplasme où ils croissent et s'amplifient par recrutement de la forme cellulaire de leurs protéines constituantes. Tous les assemblages pathogéniques suivent le même chemin pour atteindre le cytoplasme où ils peuvent croître et s'amplifier. Nous avons identifié des partenaires membranaires des assemblages fibrillaires de tau et avons documenté leur redistribution à la surface des cellules. Enfin, nous avons montré une propagation différentielle entre les isoformes 3R et 4R en utilisant une approche de vectorisation virale *in vivo* chez le rat.

Le soutien de l'ANR est mis en avant dans différents articles et revues traitant de Tau, de ses fonctions et du mécanisme d'interaction des assemblages pathogéniques avec la membrane cellulaire et ses conséquences. Il ouvre de nombreuses perspectives diagnostiques et thérapeutiques.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Dujardin S *et al.* (2015). *Neuropathol Appl Neurobiol*, 41, 59-80.
- ▶ Burlot MA *et al.* (2015) *Hum Mol Genet*, 24(21) 5965-76.
- ▶ Tardivel M *et al.*, *Acta Neuropathol Commun* 2016;4(1):117.
- ▶ Flavin WP *et al.* (2017). *Acta Neuropathol* 134(4):629-653.
- ▶ Marciniak E *et al.* (2017). *J Exp Med*, 214(8): 2257-69.
- ▶ Shrivastava AN *et al.* (2017). *Curr Op Neurol*, 30(6):589-598.
- ▶ Dujardin S *et al.* (2018). *Acta Neuropathol Commun*, 6: 132.
- ▶ Gratuze M *et al.* (2018) *Neuroendocrinology*, 107: 181-95.



Comment la protéine Tau est-elle sécrétée et transférée dans les cellules secondaires ? Elle pourrait être transportée 1/ par les vésicules extracellulaires (flèche jaune), comme les exosomes. 2/ par de plus grosses vésicules, les ectosomes (flèche orange) (150–1000 nm) provenant du bourgeonnement direct de la membrane plasmique. 3/ Tau se trouve principalement sous forme libre dans les fluides extracellulaires (en violet). Les mécanismes de sécrétion et capture restent mal définis. Le rôle des héparane sulfate protéoglycannes (HSPGs) a émergé. From Colin M *et al.*, 2020 (ref16).

- ▶ Laurent C *et al.* (2018). *Biomed J*, 41: 21-33.
- ▶ Albert M *et al.* (2019) *Brain*, 142(6):1736-1750.
- ▶ Carvalho K *et al.* (2019). *Brain*, 142(11): 3636-54.
- ▶ Leboucher A *et al.* (2019). *Neurobiol Dis*, 125 :14-22.
- ▶ Paiva I *et al.* (2019). *Glia*, 67(12):2329-2342.
- ▶ Shrivastava AN *et al.* (2019). *EMBO J*, 38, e99871.
- ▶ Colin M *et al.* (2020) *Acta Neuropathol*, 139: 3-25.
- ▶ Temido-Ferreira M *et al.* *Mol Psychiatr*, 25):1876-1900.

**Le projet SPREADTAU est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en octobre 2015 et a duré 44 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 587 746 €.**

**Partenaires :** CNRS, Gif-sur-Yvette UPR 3082, LIMMS UMI 2820 CNRS.

**COORDINATEUR**

**Luc Buée :** luc.buee@inserm.fr

Inserm, UMRS 1172 [ex U837] « Alzheimer & Tauopathies »  
<http://lucbuee.fr/>

## SynFIAD

## Déficits synaptiques et neuroinflammation dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer

## — Rappel des objectifs

SynFIAD vise à comprendre les mécanismes physiopathologiques du vieillissement pathologique des fonctions cognitives dans l'hippocampe. Nous avons travaillé sur un modèle murin de la MA, les souris APP/PS1. La mémoire épisodique, qui dépend de l'hippocampe, est le premier signe clinique de la MA, qui est associé à une activité déficiente de l'hippocampe lors de tâches d'encodage de la mémoire chez les patients. Le projet s'intéresse aux dysfonctionnements synaptiques, la perte des synapses étant le meilleur corrélat morphologique de la déficience cognitive au début de la MA, plutôt que les plaques amyloïdes bêta, ou la perte neuronale.

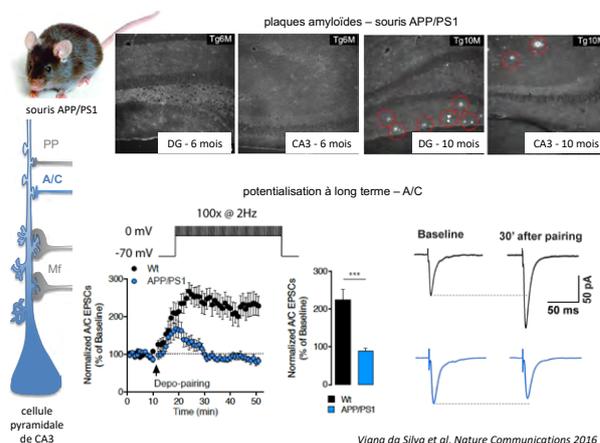
Nous nous intéressons à la région CA3 de l'hippocampe, qui code pour la mémoire spatiale et épisodique, en particulier au premier stade de l'acquisition. La plasticité synaptique, c'est à dire le changement plus ou moins durable de la force des connexions entre neurones est considérée comme un mécanisme fondamental de la mémoire. Dans les modèles murins de MA, la potentialisation synaptique à long terme (LTP) de la transmission synaptique au niveau des synapses collatérales-CA1 de Schaffer est généralement altérée dans les modèles murins de MA. Le dysfonctionnement synaptique a été principalement étudié dans CA1 ou le gyrus denté (DG), alors que très peu d'études traitent des déficits dans CA3.

Le réseau auto-associatif de connexions récurrentes entre les cellules pyramidales CA3 est connu pour permettre l'encodage de mémoires épisodiques grâce à la plasticité synaptique de ces entrées, dites associatives/commissurales (A/C). Le projet SynFIAD a consisté en une étude fonctionnelle et morphologique approfondie des propriétés des cellules pyramidales CA3, et de leurs entrées synaptiques dans un modèle murin de la MA, à un stade précoce de la pathologie et des déficits cognitifs. Nous avons aussi étudié l'interaction entre neuroinflammation et dysfonctionnement synaptique.

## — Résultats majeurs

Nous avons démontré que la LTP associative est abolie dans les cellules pyramidales de CA3 à un stade précoce de la pathologie (6 mois), avant la formation de plaques. A ce stade, commencent à apparaître des déficits de mémoire de type épisodique. Nous avons démontré que cette perte de plasticité est liée à une dérégulation des récepteurs neuronaux de l'adénosine (A2AR). La neutralisation des A2AR par suppression induite par interférence ARN dans un seul neurone postsynaptique rétablit la LTP associative dans CA3 et le traitement avec des antagonistes A2AR annule les déficits de mémoire immédiate. Les A2AR sont la cible de la caféine, et des études épidémiologiques pointent un effet bénéfique d'une consommation régulière de café sur la MA. Ces résultats encouragent le test d'efficacité thérapeutique des antagonistes A2AR chez les patients atteints de MA à un stade précoce.

Deux autres études ont décrit les déficits spécifiques observés à un stade précoce au niveau des synapses DG-CA3. Enfin dans une dernière étude effectuée à un stade plus tardif (1 an chez la souris, nous avons démontré que la LTP présynaptique des synapses DG-CA3 était altérée, suite à une accumulation de prostaglandine PGE2, en conséquence de la neuroinflammation induite par la pathologie. Nous avons pu préciser la nature du récepteur présynaptique impliqué (récepteur EP2) dans ce phénomène. Cette étude engage à mieux comprendre les liens entre



Perte de la plasticité synaptique dans la région CA3 de l'hippocampe, à un âge précoce du développement pathologique chez la souris APP/PS1. La perte de plasticité apparaît avant l'apparition de plaques amyloïdes. Elle est réversible si l'on supprime génétiquement ou que l'on bloque pharmacologiquement les récepteurs de l'adénosine de type A2A. Crédit : © Viana da Silva *et al.*, 2016.

neuroinflammation et dérégulation des mécanismes présynaptiques par des facteurs libérés par les cellules gliales en condition neuroinflammatoire dans la MA. Ces résultats confortent d'autre part notre hypothèse que la dérégulation synaptique dans la MA comporte un fort volant présynaptique.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Viana da Silva, S. *et al.*, 2019. Journal of Neuroscience 2868–18–13.
- ▶ \*Viana da Silva, S., *et al.*, (2016). Nature Communications 7, 11915.
- ▶ Maingret, V., *et al.*, (2017). Neurobiology of Aging 50, 13–24.

**Le projet SynFIAD est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en avril 2011 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 297 000 €.**

**Partenaires :** IHU-A-ICM (INSERM), ICM (CNRS).

**COORDINATEUR**

**Christophe Mulle** : christophe.mulle@u-bordeaux.fr  
CNRS UMR5091

[www.bordeaux-neurocampus.fr/team/synaptic-circuits-of-memory/](http://www.bordeaux-neurocampus.fr/team/synaptic-circuits-of-memory/)

# Interaction des protéines Tau et FKBP52 ; applications aux Tauopathies

## — Rappel des objectifs

### La protéine FKBP52 : un régulateur du fonctionnement de la protéine Tau

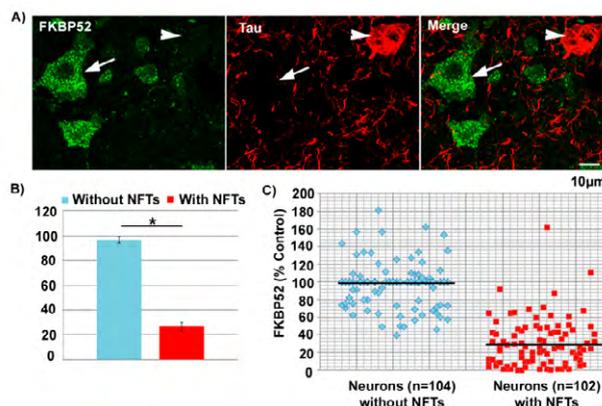
Implications de l'interaction de FKBP52 avec Tau en physio-pathologie. La perturbation du bon fonctionnement de la protéine Tau, dont le rôle est de favoriser la polymérisation et la stabilité du réseau de microtubules dans les cellules neuronales, peut avoir des conséquences dramatiques entraînant la mort de la cellule. Des formes pathologiques de Tau ont été identifiées comme constituants majeurs des agrégats qui mènent à la dégénérescence neurofibrillaire dans les Tauopathies dont fait partie la maladie d'Alzheimer (MA). La MA constitue un enjeu médical, scientifique, social et économique majeur et est, au jour d'aujourd'hui, sans traitement efficace. Nous avons mis en évidence que la protéine FKBP52, une enzyme découverte au laboratoire, interagit physiquement et de façon fonctionnelle avec Tau. Comprendre quelle est l'implication physiologique et pathologique exacte de FKBP52 sur le métabolisme, l'expression et la fonction des protéines Tau, et par conséquent dans l'évolution des tauopathies, ouvre la perspective originale d'identification d'une nouvelle cible thérapeutique dans ces pathologies.

### Caractérisation *in vitro* de l'interaction Tau/FKBP52 par des méthodes biochimiques et biophysiques, et *in vivo* sur un modèle de poisson-zèbre.

Dans ce projet TAF, nous avons développé une activité de recherche pluridisciplinaire alliant à la fois des approches en biochimie, en biologie cellulaire, en biophysique (RMN : Résonance Magnétique Nucléaire), nous permettant de caractériser *in vitro* et *in cellulo* l'interaction Tau/FKBP52, d'étudier la modulation *in vivo* de l'expression de FKBP52 dans un modèle de tauopathie chez le poisson-zèbre et d'analyser la localisation subcellulaire et le niveau d'expression de FKBP52 à partir d'échantillons de cerveau humain tauopathique, incluant la MA. L'analyse par RMN permet biophysiquement d'obtenir des informations très précises quant à la nature des acides aminés impliqués dans une interaction protéine-protéine. L'imagerie du cerveau humain a été réalisée par microscopie confocale (Leica Sp8), apportant des données à haute résolution sur la localisation cellulaire et subcellulaire de Tau et de FKBP52.

## — Résultats majeurs

Ce projet nous a permis de caractériser un rôle physio-pathologique de FKBP52 dans les tauopathies: 1) Implication *in vitro* de FKBP52 sur l'oligomérisation de Tau ; 2) Identification des acides aminés de Tau impliqués dans l'association avec FKBP52 ; 3) Rétablissement de certaines fonctions neuronales en modulant l'expression de FKBP52 dans le modèle de poisson-zèbre ; 4) Effondrement de l'expression de FKBP52 dans les cerveaux des malades décédés de la MA ou de démences fronto-temporales (FTLD-Tau) ; 5) Localisation d'une forme pathologique de Tau avec FKBP52 au niveau du système autophagie-endolysosomale dans les neurones « malades » suggérant une implication de FKBP52 dans la clairance de Tau. Nous avons donc confirmé un rôle éminent de FKBP52 sur le fonctionnement de la protéine Tau.



A) Analyse confocale de l'immunomarquage de FKBP52 (vert) et des agrégats de Tau (NFTs, rouge) sur une coupe de cortex frontal de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (MA). Certains neurones contiennent des NFTs et présentent un niveau bas de FKBP52 (pointe de flèche), tandis que d'autres dépourvus de NFTs présentent des taux normaux de FKBP52 (flèche). B) Quantification du marquage FKBP52 dans les cerveaux de MA (n=8; 13 neurones par cas). C) Diagramme de point montrant le niveau de FKBP52 de chacun des neurones étudiés.

Figure issue de la publication Meduri G *et al.* Caspase-cleaved Tau-D(421) is colocalized with the immunophilin FKBP52 in the autophagy-endolysosomal system of Alzheimer's disease neurons. *Neurobiology of aging*. 2016 Oct; 46:124-37.

## — Production scientifique et valorisation

Des avancées significatives ont été obtenues faisant l'objet de 5 publications multipartenaires internationales (Giustiniani *et al.* 2012, JAD ; Giustiniani *et al.* 2014, PNAS ; Giustiniani *et al.* 2015, Faseb J ; Meduri *et al.* 2016, Neurobiol Aging ; Kamah *et al.* 2016, J Mol Biol) et de différentes communications dans des congrès internationaux (Madrid, Espagne en octobre 2013 ; Halle, Allemagne en septembre 2013 ; Paris, France en avril 2015 ; Lille, France en avril 2018).

**Le projet TAF** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mars 2012 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 589 918 €.

**Partenaires :** CNRS Laboratoires U8576, INSERM U975 / CEA.

### COORDINATEUR

**Étienne-Émile Baulieu** : etienne.baulieu@inserm.fr  
Institut national de la santé et de la recherche médicale U788  
<http://institut-baulieu.org/>

# TaumiRNA

## MicroARNs comme modulateurs de la pathologie Tau

### — Rappel des objectifs

#### L'implication des micro-ARNs dans les maladies neurodégénératives

##### Les Tauopathies

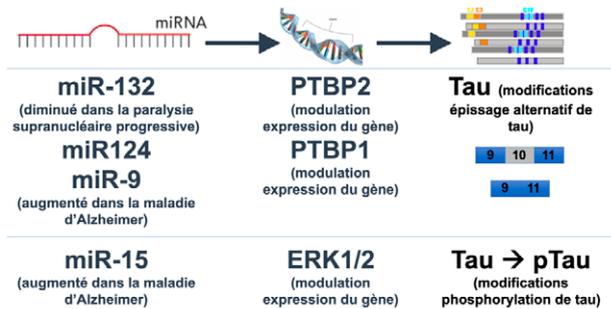
La maladie d'Alzheimer est caractérisée au niveau neuropathologique par deux types de lésions cérébrales : les dépôts amyloïdes et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire. Cette dernière résulte de l'agrégation intraneuronale de protéines associées aux microtubules, les protéines Tau. Ces protéines subissent des modifications post-transcriptionnelles, comme l'épissage alternatif, ou post-traductionnelles, comme la phosphorylation, qui peuvent conduire à leur agrégation. La maladie d'Alzheimer est une pathologie dont le risque est lié non seulement à des facteurs d'ordre génétique, comme l'ont démontré les récentes études pan-génomiques, mais également à des facteurs épigénomiques et environnementaux.

##### Les micro-ARNs dans les Tauopathies

Maintenant impliqués dans plusieurs maladies humaines, dont les maladies neuro-dégénératives, les microARNs (miARNs) constituent une nouvelle famille d'ARNs non-codants qui joue un rôle majeur dans la régulation des voies biologiques. Des études chez plusieurs modèles animaux démontrent que les miARNs sont essentiels au développement du cerveau ainsi qu'à la formation des synapses et la mémoire. De plus, des études récentes chez l'homme ont établi que des changements spécifiques de miARNs existent dans plusieurs maladies neurodégénératives. Notre programme de recherche avait pour objectif principal d'étudier l'hypothèse qu'une perte de fonction des miARNs avec l'âge puisse contribuer de façon importante aux Tauopathies. Les miARNs sont impliqués dans le réseau de régulation transcriptionnelle dans le cerveau. Leur étude permettrait de comprendre avec plus de précision les mécanismes neurologiques pouvant mener à la mort neuronale et la démence.

### — Résultats majeurs

Au cours de ce projet, il nous a été possible de démontrer, entre autres, qu'une suppression de l'enzyme Dicer dans le cerveau adulte de souris mène à une dégénérescence neuronale et une mort prématurée. Dicer est nécessaire à la maturation (et fonction) des microARNs dans la cellule. Curieusement, chez les souris Dicer mutantes, on observe une hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau, ainsi qu'un changement de l'épissage alternatif de l'ARN messager de Tau, tels qu'observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Steele-Richardson. Nos études en cellules ont permis d'identifier des microARNs spécifiques, dont miR-15a, miR-132 et miR-124, qui peuvent réguler le métabolisme de Tau. Diverses études bioinformatiques, biochimiques, et fonctionnelles nous ont permis d'identifier ces miARNs comme responsables de la régulation *in vivo* du métabolisme de Tau. Ces observations servent comme point de départ pour étudier en détail la contribution des microARNs dans la maladie d'Alzheimer et autres Tauopathies. Notre vœu est maintenant d'utiliser la souris pour mieux comprendre le rôle des microARNs candidats dans un contexte normal et pathologique du cerveau de mammifère. Nos projets de recherche seront donc axés sur l'étude de la souris sauvage et mutante (c.à.d. avec une pathologie Tau).



Crédit : © Luc Buée.

### — Production scientifique et valorisation

Ce travail a été présenté dans différents congrès internationaux sur la maladie d'Alzheimer et syndromes apparentés et a fait l'objet de 7 publications dont 3 communes aux deux partenaires. Il s'est poursuivi dans le cadre du LabEx DISTALZ et le projet « GWAS in AD: focus on miRNA » financé par CoEN Pathfinder 2015 (fiche présentée en page 74 de ce cahier).

#### Publications :

- ▶ Dorval V, Nelson PT, Hébert SS (2013) Circulating microRNAs in Alzheimer's disease: the search for novel biomarkers. *Front Mol Neurosci* 6:24.
- ▶ Dorval V, Smith PY, Delay C, Calvo E, Paniel E, Zommer N, Buée L, Hébert SS (2012) Gene network and pathway analysis of mice with conditional ablation of Dicer in post-mitotic neurons. *PLoS One* 7(8):e44060.
- ▶ Hébert SS, Sergeant N, Buée L (2012) MicroRNAs and the Regulation of Tau Metabolism. *Int J Alzheimers Dis* 2012:406561.
- ▶ Delay C, Mandemakers W, Hébert SS (2012) MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 46(2):285-90.
- ▶ Hébert SS, Nelson PT (2012) Studying microRNAs in the brain: technical lessons learned from the first ten years. *Exp Neurol* 235(2):397-401.
- ▶ Delay C, Hébert SS (2011) MicroRNAs and Alzheimer's Disease Mouse Models: Current Insights and Future Research Avenues. *Int J Alzheimers Dis* 2011:894938.
- ▶ Smith PY, Delay C, Girard J, Papon MA, Paniel E, Sergeant N, Buée L, Hébert SS (2011) MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 20(20):4016-24.

**Le projet TaumiRNA est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2011 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 216 000 €.**

**Partenaires :** Univ. Laval, QC, Canada.

#### COORDINATEUR

**Luc Buée :** luc.buee@inserm.fr

Inserm, UMRs 1172 (ex U837) « Alzheimer & Tauopathies »

<http://lucbuee.fr/>

# VADAD

## Rôle du dysfonctionnement cérébro-vasculaire lié à l'hypertension artérielle dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer : mécanismes cellulaires et moléculaires

### — Rappel des objectifs

Des anomalies cérébro-vasculaires, comprenant une angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), et des anomalies microvasculaires sont constamment observées au cours de la maladie d'Alzheimer (MA). Ces facteurs aggravent la maladie et pourraient contribuer à son déclenchement.

L'hypertension artérielle (HT) est un facteur de risque vasculaire majeur qui augmente le risque de développer une MA. Nous avons mis au point des modèles expérimentaux de MA (souris APPS1) associés à une hypertension artérielle provoquée par une injection continue d'angiotensine II pendant 4 semaines.

Les objectifs spécifiques de ce projet étaient :

1. Mise au point de nouveaux modèles expérimentaux de double pathologie (HT & MA).
2. Caractérisation de la neuropathologie et du dysfonctionnement cérébro-vasculaire dans ces modèles, en liaison avec des études comportementales.
3. Élucidation du rôle de l'angiogenèse dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

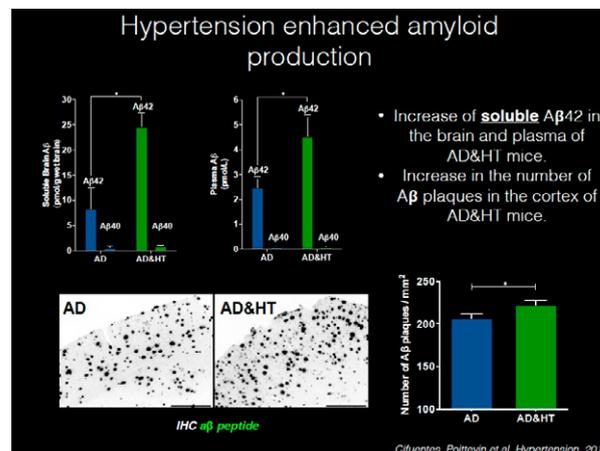
### — Résultats majeurs

1 - À l'âge de 4,5 mois, stade précoce de la MA, seules les souris APPS1 hypertendues présentaient un déficit de performances mémorielles associé à plus de dépôts amyloïdes corticaux ( $223 \pm 5$  vs.  $207 \pm 5$  plaques/mm<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ) et à un doublement des concentrations plasmatiques et cérébrales de protéine  $\beta$ -amyloïde soluble. Les souris APPS1 hypertendues avaient une réduction de 25 % de la densité capillaire corticale, et une augmentation de 40 % des dépôts amyloïdes péri-vasculaires. L'expression cérébrale du VEGFA, des NO synthases 1 and 3 et les niveaux de nitrites/nitrites était diminués chez les souris APPS1 hypertendues ( $P < 0.05$ ). Dans ce modèle expérimental, l'hypertension artérielle accélère le développement des altérations structurales et fonctionnelles de la MA en relation avec une raréfaction microvasculaire et une diminution de la production de NO.

2 - Nous avons ensuite étudié les rôles différentiels du déficit en NO et du niveau de pression artérielle dans ce modèle APPS1. Nos résultats suggèrent que la biodisponibilité diminuée du NO accélère la progression de la MA, la charge amyloïde et le déficit cognitif indépendamment du niveau de pression artérielle. Seule l'angiopathie amyloïde cérébrale semble être dépendante du niveau de pression artérielle.

3 - Nous avons ensuite montré que, dans ce modèle murin APPS1, la dysfonction vasculaire est également systémique avec un retard majeur de revascularisation post-ischémique de la patte.

4 - Nous avons enfin réalisé, en collaboration avec une équipe de Montréal, un modèle de constriction chirurgicale de l'aorte thoracique horizontale qui induit une hypertension dans la carotide droite donc de l'hémi-cerveau droit alors que le gauche reste soumis à une pression normale. Chez la souris témoin, l'HT induit une diminution de la vasodilatation endothéliale dépendante, une altération de la barrière hémato-encéphalique, de microhémorragies, et une réduction de la densité microvasculaire d'où résulte une hypo perfusion sévère et une sénescence des cellules parenchymateuses. Ces dommages étaient associés à une inflammation hémi-cérébrale, et des altérations majeures de l'apprentissage et de la mémoire spatiale. Chez la souris APP/PS1, la constriction aortique aggrave les lésions cérébro-vasculaires, l'accumulation de  $\beta$ -amyloïde et le déficit d'apprentissage.



Crédit : © Cifuentes, Poittevin et al., Hypertension, 2015.

### — Production scientifique et valorisation

- Cifuentes D, Poittevin M, Dere E, Broquères-You D, Bonnin P, Benessiano J, Pocard M, Mariani J, Kubis N, Merkulova-Rainon T, Lévy BI. Hypertension Accelerates the Progression of Alzheimer-like Pathology in a Mouse Model of the Disease. Hypertension 2015 ;65:218-24.
- Cifuentes D, Poittevin M, Bonnin P, Ngkelo A, Kubis N, Merkulova-Rainon T, Lévy BI. Inactivation of Nitric Oxide Synthase Exacerbates the Development of Alzheimer Disease Pathology in APPS1 Mice (Amyloid Precursor Protein/Presenilin-1). Hypertension. 2017;70:613-623.
- Merkulova-Rainon T, Mantsounga CS, Broquères-You D, Pinto C, Vilar J, Cifuentes D, Bonnin P, Kubis N, Henrion D, Silvestre JS, Lévy BI. Peripheral post-ischemic vascular repair is impaired in a murine model of Alzheimer's disease. Angiogenesis. 2018;21:557-569.
- de Montgolfier O, Pinçon A, Pouliot P, Gillis MA, Bishop J, Sled JG, Villeneuve L, Ferland G, Lévy BI, Lesage F, Thorin-Trescases N, Thorin É. High Systolic Blood Pressure Induces Cerebral Microvascular Endothelial Dysfunction, Neurovascular Unit Damage, and Cognitive Decline in Mice. Hypertension. 2019;73:217-228.

Le projet VADAD est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en octobre 2012 et a duré 40 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 566 269 €.

Partenaires : Inserm Délégation Paris 7 UMR 965, CNRS Île-de-France Paris B UMR 7102.

#### COORDINATEUR

Bernard Lévy : [bernard.levy@inserm.fr](mailto:bernard.levy@inserm.fr)  
Institut des Vaisseaux et du Sang

# VGLUTAD

## La transmission glutamatergique dans la maladie d'Alzheimer

### — Rappel des objectifs

#### VGLUT Biomarqueur des fonctions cognitives dans la maladie d'Alzheimer

Le projet VGLUTAD avait pour objectif de valider un nouveau biomarqueur lié au déclin cognitif dans la MA et de développer des outils pharmacologiques pour le suivi de ce biomarqueur. Ce projet était basé sur des travaux antérieurs sur une petite cohorte de patients montrant une corrélation entre la baisse du taux d'un transporteur (VGLUT) dans une région du cortex préfrontal et la baisse de cognition chez ces patients.

Le glutamate étant le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau, il est impliqué dans la plupart des fonctions normales du système nerveux central notamment dans les fonctions cognitives supérieures mais également dans un grand nombre de pathologies neurologiques ou psychiatriques. Il est notamment le transmetteur utilisé par les cellules pyramidales du cortex cérébral et de l'hippocampe. Plus de 70 % des synapses corticales sont glutamatergiques. Un déficit de la transmission glutamatergique lié à une perte des cellules pyramidales et de leurs terminaisons contribue à la pathophysiologie de la MA. Avant sa libération et permettant la transmission synaptique, le glutamate est accumulé dans des vésicules synaptiques par le transporteur VGLUT qui se présente sous 3 formes VGLUT1-3. VGLUT1 est exprimé principalement par les neurones du cortex et de l'hippocampe, VGLUT2 dans les régions sous-corticales et VGLUT3 est dispersé. Dans une cohorte de 17 patients décédés à différents stades de la MA, le taux de VGLUT1-2 avait été mesuré post-mortem dans le cortex préfrontal (aire BA9). Avant leur décès, leur statut cognitif avait été évalué, ce qui a permis d'établir une forte corrélation entre la baisse de VGLUT1 et l'évolution du score de démence au cours de la progression de la maladie. Ces résultats ont conduit à proposer le transporteur **VGLUT1** comme **biomarqueur de la MA**.

Le projet VGLUTAD comportait 3 volets : 1) confirmation de l'hypothèse du biomarqueur VGLUT sur une large cohorte de patients, 2) une étude mécanistique de la disparition de VGLUT1 chez la souris, 3) le développement de ligands de VGLUT.

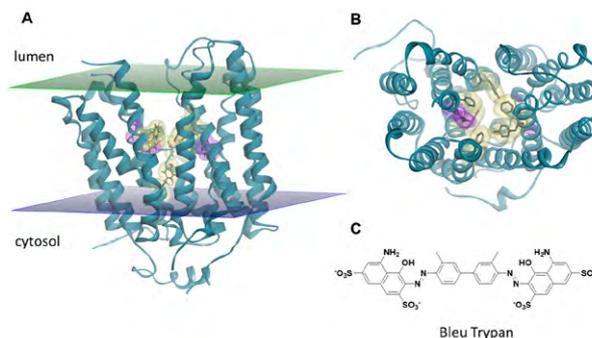
### — Résultats majeurs

#### Analyse des échantillons (BA9) de 171 patients provenant du Mount Sinai Hospital, à New York

Parmi les différents marqueurs de la neurotransmission (VGLUT1-3, VIAAT, somatostatine, ChAT,  $\alpha$ -tubuline, synaptophysine et PSD95) analysés sur des échantillons de la région préfrontale, BA9, VGLUT1 est le plus fortement corrélé à l'état de démence mais on n'a pas pu démontrer la corrélation avec les niveaux cognitifs des patients. Les résultats de cette étude n'ont donc pas pu valider VGLUT1 dans le cortex préfrontal comme biomarqueur de la MA. Des résultats récents montrent une baisse de glutamate et glutamine dans des prélèvements de Liquide Cérébro-Spinal (LCS) de patients potentiels de MA, ce qui incite à poursuivre l'analyse de marqueurs glutamatergiques dans d'autres régions du cerveau comme l'hippocampe.

#### Développement de ligands des VGLUT

Parallèlement, l'équipe de chimistes a travaillé sur la conception et la synthèse d'inhibiteurs compétitifs de VGLUT dans le but d'obtenir des outils pharmacologiques pour l'imagerie des VGLUT. Cette étude a porté sur la préparation d'analogues du Bleu Trypan (BT), connu pour inhiber efficacement les VGLUT. Les modulations autour de la structure du BT n'ont conduit qu'à



Structure par cryo microscopie électronique du transporteur VGLUT2 (code PDB 6V4D, Li *et al.* Science 2020). A) vue de profil, les résidus aromatiques (jaune) et basiques (violet) situés dans le canal où se lient les inhibiteurs, sont représentés. La membrane est schématisée par les deux plans. B) vue de dessus. C) Structure du Bleu Trypan.

La représentation 3D a été réalisée avec Discovery Studio (Biovia Dassault Systèmes, Velizy-Villacoublay). Crédit : © F. Acher.

un seul composé environ 2 fois plus efficace. Le modèle 3D du canal de VGLUT1 où se fixe l'inhibiteur a révélé les contraintes stériques. Les marqueurs d'imagerie et du LCS ont permis des avancées dans le diagnostic de la MA, mais des biomarqueurs complémentaires sont encore attendus. Dans ce cadre, la transmission glutamatergique reste une piste à poursuivre.

### — Production scientifique et valorisation

- Poirel O *et al.*, Sci Rep. 2018 Jan 17;8(1):938.
- Favre-Besse FC *et al.*, Eur J Med Chem. 2014 May 6;78:236-47.
- Poirel O *et al.*, Neuropharmacology. 2020 Mar 1;164:107902.

**Le projet VGLUTAD** est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2011 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 419 354 €.

**Partenaires** : Consortium Franco-Canadien avec une équipe de l'université McGill de Montréal et de l'université Pierre et Marie Curie, et deux équipes de l'université Paris Descartes CNRS-INSERM.

#### COORDINATRICE

**Francine Acher** : francine.acher@parisdescartes.fr  
Université Paris Descartes CNRS

<http://lcbpt.biomedicale.parisdescartes.fr/biological-chemistry/metabolism-pharmacology-and-neurochemistry/francine-acher>

## ViAGeCo

# Vieillesse pathologique et non-pathologique, Activité physique, Génotype et Cognition

## — Rappel des objectifs

Les effets positifs d'un exercice chronique sur le vieillissement cognitif ne sont aujourd'hui plus contestés aussi bien chez l'homme que chez l'animal. En revanche, les mécanismes biologiques, neurophysiologiques et psychologiques qui sous-tendent ces effets font l'objet d'un débat animé dans la communauté scientifique. L'objectif principal du présent projet consistait à étudier les effets de la pratique régulière d'une activité physique sur les fonctions cognitives et la santé cérébrale de personnes âgées de plus de 60 ans.

L'établissement que la pratique régulière d'une activité physique peut entraîner des effets bénéfiques sur la santé cérébrale et cognitive de personnes âgées passe obligatoirement par la mise en place d'une étude interventionnelle comprenant un groupe contrôle qui subit un traitement inopérant (programme de marche légère ou maintien d'un style de vie sédentaire) versus un groupe d'intérêt qui subit un traitement supposé efficace (programme de marche vigoureuse et de renforcement musculaire). La compréhension des mécanismes neurophysiologiques qui sous-tendent de tels effets positifs ne peut quant à elle se faire qu'en utilisant des techniques d'imagerie cérébrale telle que l'imagerie par résonance magnétique qui permet de quantifier les volumes de matière grise (cellules nerveuses) et de matière blanche (grands faisceaux de fibres nerveuses entourées de myéline) dans différentes régions cérébrales d'intérêt. Par exemple, l'exercice chronique peut entraîner une augmentation du volume de matière grise de l'hippocampe, une structure nerveuse impliquée dans le stockage en mémoire à long terme des souvenirs de la vie de tous les jours.

## — Résultats majeurs

Les premiers résultats obtenus dans le cadre d'une étude transversale préliminaire à l'étude interventionnelle montrent que nous ne sommes pas tous aussi sensibles aux effets de l'activité physique et de l'exercice chronique. Ainsi les femmes âgées (Fagot *et al.*, 2019), d'une part, et les seniors porteur d'un gène du facteur neurotrophique dérivé du cerveau ayant une configuration valine-valine (Canivet *et al.*, 2015, 2017), d'autre part, seraient plus sensibles aux effets négatifs de la sédentarité sur la santé cognitive. La sédentarité serait ainsi un facteur de risque accélérant le vieillissement cognitif. Inversement, la pratique de l'activité physique telle que la marche vigoureuse combinée à du renforcement musculaire serait un bon moyen de ralentir le vieillissement cognitif, de stimuler les fonctions exécutives et en retour de faciliter l'adhésion à la pratique régulière de l'activité physique sur du plus long terme (Audiffren & André, 2015, 2019). L'étude interventionnelle proprement dite nous a permis d'inclure 138 participants randomisés dans trois groupes d'interventions : 47 participants dans le groupe « marche vigoureuse et renforcement musculaire », 48 participants dans le groupe « Marche légère et étirements » et 40 dans le groupe contrôle « Pas de changement dans les habitudes de vie ». L'analyse principale, en intention de traiter (ITT), nous a permis de comparer les trois groupes d'intervention. Les premières analyses ont consisté à faire des Analyses Univariées ou Multivariées de la Variance contrastant les résultats des groupes expérimentaux. Les analyses n'ont pas montré d'impact significatif du programme d'activités physiques sur la mesure des fonctions exécutives à 6 mois ou à 12 mois. L'analyse des critères secondaires concernant les performances physiques n'a pas non plus montré d'effet significatif à 6 mois. Ces résultats suggèrent que les instructions données aux différents groupes ont

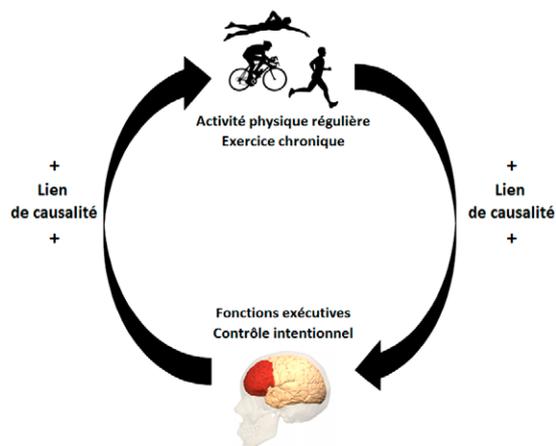


Illustration de la relation bidirectionnelle entre exercice chronique et fonctions exécutives. La flèche de droite indique le lien de causalité entre exercice chronique et fonctions exécutives ; c'est-à-dire le fait que la pratique régulière d'une activité physique entraîne une amélioration significative des fonctions exécutives. La flèche de gauche indique le lien de causalité entre les fonctions exécutives et la pratique régulière de l'activité physique ; c'est-à-dire qu'un haut niveau d'efficacité des fonctions exécutives conduit à une meilleure adhésion à la pratique régulière d'exercices physiques. Crédit : © Michel Audiffren.

été faiblement respectées. Des analyses complémentaires et plus poussées sont actuellement en cours.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Audiffren, M., & André, N. (2015). The strength model of self-control revisited: Linking acute and chronic effects of exercise on executive functions. *Journal of Sport and Health Science*, 4, 30-46.
- ▶ Audiffren, M., & André, N. (2019). The exercise-cognition relationship: A virtuous circle. *Journal of Sport and Health Science*, 8, 339-347.
- ▶ Canivet, A., Albinet, C. T., André, N., Pylouster, J., Rodríguez-Ballesteros, M., Kitzis, A., & Audiffren, M. (2015). Effects of BDNF polymorphism and physical activity on episodic memory in the elderly: a cross sectional study. *European Review of Aging and Physical Activity*, 12, 15.
- ▶ Canivet, A., Albinet, C. T., Rodríguez-Ballesteros, M., Chicherio, C., Fagot, D., André, N., & Audiffren, M. (2017). Interaction between BDNF polymorphism and physical activity on inhibitory performance in the elderly without cognitive impairment. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11, 541.
- ▶ Fagot, D., Chicherio, C., Albinet, C. T., André, N., & Audiffren, M. (2019). The impact of physical activity and sex differences on intraindividual variability in inhibitory performance in older adults. *Aging, Neuropsychology, and Cognition*, 26, 1, 1-23.

**Le projet ViAGeCo est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en octobre 2012 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 387 764 €.**

**Partenaires :** CHU de Bordeaux – Université de Bordeaux, Centre de Recherche Epidémiologique et Biostatistique.

### COORDINATEUR

**Michel Audiffren** : michel.audiffren@univ-poitiers.fr  
CNRS CeRCA / Université de Poitiers

# Maladie d'Huntington

<b>ACTIVASTRO</b>	p. 93
<b>FOXODIRECT</b>	p. 94
<b>HDeENERGY</b>	p. 95
<b>HexpanD</b>	p. 96
<b>HUGE</b>	p. 97
<b>HURIT</b>	p. 98
<b>ModelPolyQ</b>	p. 99

# ACTIVASTRO

## Modulation sélective des astrocytes réactifs : Suivi *in situ* par résonance magnétique et contribution à la mort neuronale dans la maladie de Huntington

### — Rappel des objectifs

Les astrocytes sont des partenaires indispensables pour les neurones dans le cerveau. En conditions pathologiques, y compris au cours des maladies neurodégénératives, les astrocytes changent et deviennent réactifs. Cette réponse se visualise principalement par des changements morphologiques, mais ses conséquences fonctionnelles restent mal connues. Etant donné l'importance des astrocytes dans l'homéostasie cérébrale, tout changement de leur fonctionnement pourrait avoir des effets majeurs sur les neurones et leur survie. Les astrocytes réactifs constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles pour les maladies neurodégénératives. De plus, les astrocytes réactifs accompagnent toute situation pathologique dans le cerveau, et représentent donc des biomarqueurs potentiels pour suivre l'évolution des maladies cérébrales.

Dans ce projet, nous avons développé des outils moléculaires basés sur des vecteurs viraux pour manipuler sélectivement l'état des astrocytes réactifs dans le cerveau. Nous avons pu ensuite évaluer des techniques d'imagerie cérébrale pour suivre l'état des astrocytes *in situ* et étudier le rôle des astrocytes réactifs dans certaines maladies neurodégénératives *in vivo*.

### — Résultats majeurs

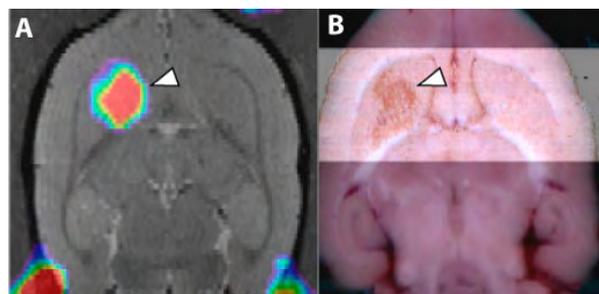
Nous avons développé des vecteurs viraux qui permettent l'activation ou la désactivation contrôlée des astrocytes dans le cerveau de rongeur en ciblant la voie de signalisation JAK-STAT3 dans ces cellules (Ben Haim *et al.*, 2015). Après validation de ces vecteurs, nous avons évalué différentes techniques d'imagerie cérébrale pour détecter la réactivité astrocytaire *in situ*. Nous avons en particulier montré que certains radiotraceurs utilisés en tomographie par émission de positons, qui étaient utilisés comme des traceurs de l'activation microgliale, détectent en réalité aussi les astrocytes réactifs (Lavisse *et al.*, 2012). Nous avons également montré que l'état réactif des astrocytes conduisait à des changements de plusieurs métabolites cérébraux détectables par spectroscopie par résonance magnétique (Carrillo de Sauvage *et al.*, 2015). Enfin, nous avons étudié le rôle des astrocytes réactifs dans des modèles murins de la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative chronique (Ben Haim *et al.*, 2015 ; Abjean *et al.*, en préparation). L'efficacité et la versatilité de ces outils moléculaires nous a aussi permis d'étudier les astrocytes réactifs dans différents modèles de maladies neurodégénératives, notamment de maladie d'Alzheimer (Ceyzériat *et al.*, 2018, Guillemaud *et al.*, 2019).

L'ensemble de nos résultats souligne que les astrocytes changent de manière significative quand ils deviennent réactifs, non seulement au niveau morphologique mais aussi moléculaire et peuvent directement influencer plusieurs aspects pathologiques des maladies neurodégénératives. Néanmoins, leurs réponses sont complexes et contexte-dépendants. Elles doivent être étudiées précisément, avec des approches moléculaires et fonctionnelles de pointe, pour in fine pouvoir cibler ces cellules à des fins thérapeutiques.

### — Production scientifique et valorisation

Imagerie des astrocytes réactifs :

- Lavisse S., *et al.* Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO PET imaging. *J. Neurosci.* 2012. 32(32):10809-18.



La tomographie par émission de positons permet de détecter les astrocytes réactifs *in vivo* (flèche en A), ce qui est confirmé par un marquage immunohistologique *post-mortem* (flèche en B). Image modifiée de Lavisse *et al.*, *J. Neuroscience*, 2012.

- Carrillo-de Sauvage M.-A., *et al.* The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum : an *in vivo* multimodal magnetic resonance imaging study. *J Cereb Blood Flow Meta.* 2015. 35:917-21.

Astrocytes réactifs et maladie de Huntington :

- Ben Haim L., *et al.* The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's disease *J Neurosci.* 2015. 35(6):2817-29.

Astrocytes réactifs et maladie d'Alzheimer :

- Ceyzériat K., *et al.* Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications.* 2018. 16:6(1):104.
- Guillemaud O., *et al.* (2019). Complex roles for reactive astrocytes in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *BioRxiv.* doi:https://doi.org/10.1101/797662

Notre travail a aussi conduit à la publication de 3 revues, dont 2 invitées :

- Ben Haim L., *et al.* Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 2015. 9: 278.
- Ceyzériat K., *et al.* The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience.* 2016. 330:205-18.
- Escartin C\*, Guillemaud O., Carrillo-de Sauvage M., Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia.* 2019. 67: 2221-47.

Le projet **ACTIVASTRO** est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a commencé en octobre 2010 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 228 252 €.

#### COORDINATRICE

**Carole Escartin** : carole.escartin@cea.fr  
MIRcen, unité mixte CNRS CEA, Univ. Paris Sud Paris  
Saclay UMR9199  
<http://jacob.cea.fr/drf/ifrancoisjacob/english/Pages/Departments/MIRcen/ResearchThemes/Reactive-astrocytes.aspx>

# FOXODIRECT

## Mécanismes impliqués dans la répression directe de FOXO par des facteurs développementaux et les déficits de la survie neuronale

### — Rappel des objectifs

Les systèmes de réponse au stress cellulaire sont largement conservés au travers des espèces, permettant de réparer les composants cellulaires et de maintenir l'activité cellulaire dans plusieurs tissus et dans plusieurs types cellulaires. Ces systèmes de compensation sont notamment sous contrôle des protéines FOXO, une famille de facteurs de transcription qui contribuent à la résilience cellulaire et tissulaire mais qui peuvent aussi contribuer à la mort cellulaire si les conditions de stress sont trop fortes.

À ce titre, les protéines FOXO montrent des effets neuroprotecteurs dans plusieurs modèles des phases précoces des maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington. Cependant, les protéines FOXO ne sont pas de bonnes cibles thérapeutiques du fait de leur activité large spectre. En effet, elles agissent sur plusieurs mécanismes de compensation cellulaire, régulent l'expression de plusieurs centaines de gènes.

Par ailleurs, les protéines FOXO n'agissent pas seules et mobilisent plusieurs protéines partenaires. Enfin le catalogue des gènes cibles des FOXO dans la maladie de Huntington est inconnu. Pour comprendre comment les FOXO fonctionnent dans ce contexte, et pour exploiter cette information à des fins thérapeutiques, nous avons intégré analyses de la signalisation, du transcriptome et de la viabilité cellulaire. Cette approche a permis des avancées sur un plan fondamental et sur un plan translationnel.

### — Résultats majeurs

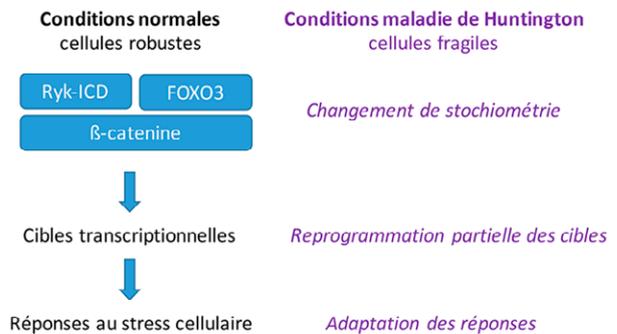
FOXODIRECT a réalisé une analyse fine des régulateurs de l'activité des FOXO, en interrogeant les régulateurs amont, les co-facteurs et les effecteurs aval grâce à plusieurs modèles de la maladie de Huntington, chez le nématode *C. elegans*, dans des cellules murines et dans des cellules humaines (cellules pluripotentes induites).

Cette approche a permis de mettre en lumière un modèle de régulation de l'activité des FOXO et d'expression de leurs cibles transcriptionnelles dans lequel la cellule reprogramme une grande partie des cibles de FOXO en réponse au stress chronique qui est induit par la huntingtine, le gène muté dans la maladie de Huntington. Ce modèle a aussi permis d'identifier avec précision les mécanismes pathogéniques auxquels les FOXO s'opposent permettant d'identifier un nouveau rationnel thérapeutique.

### — Production scientifique et valorisation

► Farina F, Lambert E, Commeau L, Lejeune FX, Roudier N, Fonte C, Parker JA, Boddaert J, Verny M, Baulieu EE and Neri C. (2017) The stress response factor daf-16/FOXO is required for multiple compound families to prolong the function of neurons with Huntington's disease. *Nature Scientific Reports* 2017, 7:4014. doi: 10.1038/s41598-017-04256-w.

► Vazquez-Manrique RV, Farina F, Cambon K, Sequedo MD, Parker AJ, Milan JM, Weiss A, Deglon N and Neri C. (2015) AMPK activation protects from neuronal dysfunction and vulnerability across nematode, cellular and mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 25 :1043-58 doi: 10.1093/hmg/ddv513.



Modèle explicatif des stratégies cellulaires de résistance à la maladie de Huntington qui mobilisent les facteurs FOXO et leurs protéines partenaires comme la β-caténine ou le domaine intracellulaire du récepteur Wnt Ryk (Ryk-ICD). La connaissance des réponses adaptatives (en mauve) permet de définir de nouvelles approches thérapeutiques visant à prolonger leur efficacité. Crédit : © Inserm ERL U1164.

► Tourette C, Francesca F, Vazquez-Manrique RV, Orfila AM, Voisin J, Hernandez S, Offner O, Parker JA, Menet S, /.../, Lu W & Neri C. (2014) The Wnt Receptor Ryk reduces neuronal and cell Survival capacity by repressing FOXO Activity during the early Phases of mutant huntingtin pathogenicity. *PLoS Biology*, doi: 10.1371/journal.pbio.1001895.

Les résultats ont donné lieu à divers produits de diffusion et de valorisation, notamment plusieurs communications dans des congrès internationaux, des communications auprès des associations, ainsi qu'une demande de brevet sur une méthode de traitement de la maladie de Huntington.

**Le projet FOXODIRECT** est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a commencé en février 2013 et a duré 34 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 240 557 €.

**Partenaires** : Inserm APHP-Pitié Salpêtrière.

#### COORDINATEUR

**Christian Neri** : christian.neri@inserm.fr

Institut National de la Santé et de la recherche Médicale / CNRS UMR 8256

<https://www.ibps.upmc.fr/fr/Recherche/umr-8256/brainc>

## HDeENERGY

## Validation de marqueur d'imagerie moléculaire dans la maladie de Huntington en vue d'essais thérapeutiques ciblant le cycle de Krebs

## — Rappel des objectifs

Le projet HDeENERGY se fonde sur diverses observations montrant que des défauts énergétiques sont souvent associés aux maladies neurodégénératives, en particulier dans la MH. La MH est une maladie neurodégénérative génétique liée à la mutation du gène HTT, pour laquelle il n'existe aucune thérapie efficace. Les déficits métaboliques pourraient être détectés par RMN, ce qui constituerait une méthode non-invasive de choix pour caractériser l'atteinte fonctionnelle du cerveau chez les patients au cours de leur maladie.

L'objectif principal du projet HDeENERGY a donc été de développer de nouvelles méthodes d'exploration par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et par spectroscopie par résonance magnétique (SRM) visant à détecter et quantifier des atteintes du métabolisme au niveau cérébral. La stratégie du projet était de développer ces méthodes extrêmement pointues dans des modèles animaux de la MH, et lorsque cela était approprié, de porter ces méthodes à une étape exploratoire en clinique chez des porteurs du gène muté HTT.

## — Résultats majeurs

**Sur le plan méthodologique**, le projet a conduit à l'optimisation des méthodes d'investigation en utilisant des champs magnétiques élevés (3 tesla chez l'homme et 11.7 tesla pour les études animales). Les chercheurs de HDeENERGY ont développé et optimisé la détection, la quantification et les vitesses de synthèse de différents métabolites cérébraux liés au métabolisme énergétique. Plusieurs défis méthodologiques ont été abordés avec succès. En particulier, la MRS du phosphore 31 et l'imagerie gluCEST (glutamate Chemical Exchange Saturation Transfer). D'autres méthodes d'IRM ou MRS ont également été développées pour parfaire le suivi des modèles animaux ou sujets humains par une approche globale, multiparamétrique.

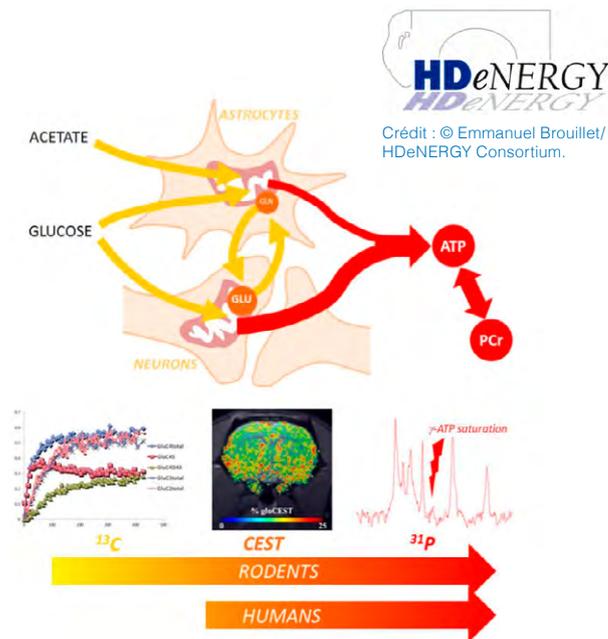
**Sur le plan préclinique**, HDeENERGY s'est focalisé sur deux modèles génétiques de la maladie, les souris « Ki140CAG » et les rats « BACHD ».

Les analyses par  $^{31}\text{P}$ -SRM,  $^1\text{H}$ -SRM et gluCEST ont montré l'existence d'une réorganisation du métabolisme énergétique chez les modèles rongeurs non suspectée jusqu'alors. La méthode gluCEST, grâce à sa grande résolution spatiale, a montré des anomalies des niveaux de glutamate dans les régions cérébrales connues pour être les plus atteintes dans la MH mais également, de manière très inattendue, dans le corps calleux. Ces observations ont conduit le consortium à modifier l'essai clinique pour étudier le corps calleux chez les patients porteurs du gène.

**Sur le plan clinique**, la  $^1\text{H}$ -MRS a montré une baisse de glutamate dans le striatum des patients, même peu avancés dans la pathologie, en accord avec les observations faites sur les modèles animaux. La  $^{31}\text{P}$ -MRS a identifié une baisse d'activation métabolique dans le cortex dans un test d'activation visuelle chez les patients. D'autres modalités d'IRM ont permis de mettre en évidence des anomalies de la matière blanche, dont le corps calleux et l'atteinte des réseaux neuronaux fonctionnels.

HDeENERGY a permis aux acteurs du consortium d'aller plus loin dans leur exploration de la MH. En particulier, ces recherches ont permis aux chercheurs de lancer de nouveaux projets financés par des appels à projet compétitifs (e.g. un projet européen eRARE ERA-NET et une ANR JCJC).

Enfin, grâce à son approche translationnelle, le projet HDeENERGY a contribué à l'amélioration du spectre des outils non-invasifs pour mieux suivre les porteurs du gène au cours de leur maladie.



Crédit : © Emmanuel Brouillet / HDeENERGY Consortium.

Étude du métabolisme cérébral impliquant les neurones et les astrocytes dans la maladie de Huntington en utilisant différentes méthodes d'IRM et de spectroscopie RMN. Crédit : © UMR9199/MIRcen/CEA.

De plus l'optimisation des méthodes de SRM et d'IRM laisse entrevoir une amélioration du suivi de l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques pour la MH, et possiblement pour d'autres maladies neurodégénératives.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Tiret B *et al.*, *Neurochem Res.*, 2015, 40(12):2482-92.
- ▶ Tiret B *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(9):1513-8.
- ▶ Pépin *et al.*, *NeuroImage*, 2016, 139:53-64.
- ▶ Liot G. *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017, 37(6):1927-1943.
- ▶ Adanyeguh IM *et al.*, *NMR Biomed*. 2018 Mar;31(3).
- ▶ Adanyeguh IM *et al.*, *Neurology*. 2015 Feb 3;84(5):490-5.
- ▶ Adanyeguh IM *et al.*, *Microstructural alterations in early stage Huntington disease*. Submitted.

**Le projet HDeENERGY** est un projet collaboratif de recherche translationnelle. Le projet a commencé en janvier 2015 et a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 302 824 €.

**Partenaires** : Département de Génétique de l'Hôpital de la Salpêtrière, ICM (Paris).

**COORDINATEUR**

**Emmanuel Brouillet** : emmanuel.brouillet@cea.fr  
Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, CEA-CNRS-  
Université Paris-Saclay  
<http://jacob.cea.fr/drif/francoisjacob/Pages/Departements/MIRcen/UMR9199.aspx>

## HexpanD

## Mécanismes de l'instabilité des expansions de trinuécléotides CAG dans la maladie de Huntington

## — Rappel des objectifs

**Mécanismes responsables de l'instabilité de la répétition CAG dans la maladie de Huntington**

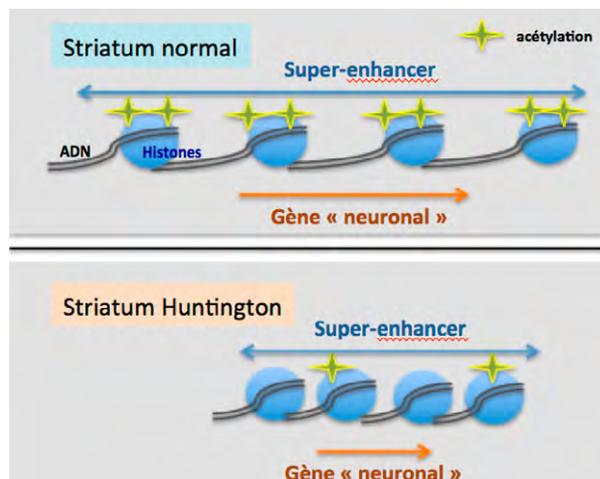
La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative causée par une mutation particulière, une expansion de répétitions CAG dans le gène de la Huntingtine (HTT). La mutation entraîne la production d'une protéine HTT mutée, qui possède une queue de polyglutamine particulièrement toxique pour les neurones du striatum dans le cerveau. Le mécanisme de la sélectivité tissulaire dans la MH n'est pas clair, mais implique vraisemblablement l'instabilité de la mutation, qui est particulièrement élevée dans le striatum : la taille de la répétition augmente dans le striatum des patients avec le temps, ce qui conduit à la production de HTT mutée de toxicité croissante et accélère la progression de la maladie. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes fondamentaux associés à l'instabilité des répétitions CAG dans la MH. Cela pourrait permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons examiné le rôle de la réparation par excision de base, des processus épigénétiques et de la transcription dans le mécanisme de sélectivité tissulaire de l'instabilité de l'expansion CAG à partir de modèles murins de la maladie et en comparant des tissus montrant des degrés importants et faibles d'instabilité (le striatum et le cervelet, respectivement). Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'une combinaison de mécanismes impliqués dans le contrôle de la physiologie de l'ADN et de l'ARN contribuent à la grande instabilité de l'expansion CAG dans le striatum des patients Huntington.

**Des tests de réparation de l'ADN et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pour étudier l'instabilité de l'expansion CAG associée à la MH**

Différentes méthodes ont été utilisées pour examiner le mécanisme d'instabilité des expansions CAG à partir de tissus murins, y compris des tests de réparation de l'ADN et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Les tests de réparation de l'ADN ont été effectués en vue de comparer les activités de réparation par excision de base (BER) du striatum et du cervelet. A cette fin, des tests ont été réalisés à partir de protéines recombinantes ou à partir d'extraits protéiques provenant de striatum et de cervelet murins. Des expériences de ChIP associées à des analyses d'expression ont été effectuées à partir de striatum et de cervelet de souris Huntington afin d'étudier le rôle des mécanismes épigénétiques dans l'instabilité de l'expansion CAG. Des approches permettant à la fois une analyse centrée sur le locus Huntington (ChIP-PCR) et à l'échelle du génome (ChIP-seq, RNA-seq) ont été entreprises.

## — Résultats majeurs

- La séquence nucléotidique, le lieu du dommage à l'ADN et la stoechiométrie des protéines influencent la réparation de répétitions CAG/CTG par le BER. La réparation de répétitions CAG/CTG nécessite la voie longue du BER, qui est moins efficace dans le striatum comparé au cervelet.
- La dynamique de transcription du gène de la HTT est variable selon les tissus et influence l'instabilité de l'expansion CAG associée à la MH.
- La MH entraîne des dérégulations transcriptionnelles importantes, particulièrement dans le striatum, qui résultent d'une altération préférentielle des super-enhancers, une classe d'enhancers impliquée dans la régulation des gènes de l'identité cellulaire.



Dans un striatum normal (en haut), l'hyperacétylation au niveau du super-enhancer provoque un relâchement de la chromatine et une forte activation transcriptionnelle du gène sous son contrôle. Dans le striatum Huntington (en bas), la chromatine est moins acétylée au niveau du super-enhancer, ce qui entraîne une baisse d'activité du gène associé.  
Figure issue de Goula AV, Festenstein R, Merienne K. *Transcription*. 2013 Jul-Aug; 4(4):172-6. doi: 10.4161/trns.25971. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23989661.

## — Production scientifique et valorisation

- Neuronal Identity Genes Regulated by Super-Enhancers Are Preferentially Down-Regulated in the Striatum of Huntington's Disease Mice. Mayada Achour, Stéphanie Le Gras, Céline Keime, Frédéric Parmentier, François-Xavier Lejeune, Anne-Laurence Boutillier, Christian Néri, Irwin Davidson and Karine Merienne. *Human Molecular Genetics* 2015 ddv009.
- Tissue-dependent regulation of RNAP II dynamics: The missing link between transcription and trinucleotide repeat instability in diseases? Goula AV, Festenstein R, Merienne K. *Transcription*. 2013 2;4(4).
- Abnormal Base Excision Repair at Trinucleotide Repeats Associated with Repeats : A tissue-selective Mechanism. Goula AV, Merienne K. *Genes*. 2013 4 :375-387.
- Transcription Elongation and Tissue-Specific Somatic CAG Instability. Goula AV, Stys A, Chan JP, Trottier Y, Festenstein R, Merienne K. *PLoS Genetics*. 2012 8:e1003051.
- The nucleotide sequence, DNA damage location, and protein stoichiometry influence the base excision repair outcome at CAG/CTG repeats. Goula AV, Pearson CE, Della Maria J, Trottier Y, Tomkinson AE, Wilson DM 3rd, Merienne K. *Biochemistry*. 2012 8;51:3919-32.

Le projet HexpanD est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2012 et a duré 24 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 239 000 €.

**COORDINATRICE**

**Karine Merienne** : karine.merienne@unistra.fr  
Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine

# HUGE

## Huntingtin in neurogenesis

### — Rappel des objectifs

Comprendre comment une protéine d'échafaudage telle que la huntingtine (HTT) – dont la mutation est à l'origine de la maladie de Huntington – coordonne les mécanismes cellulaires et moléculaires gouvernant la division de progéniteurs neuronaux et leur différenciation au cours de la neurogenèse développementale et adulte en situation physiologique, ou physiopathologique de la maladie de Huntington.

### — Résultats majeurs

Nous avons travaillé autour des axes de recherche suivants:

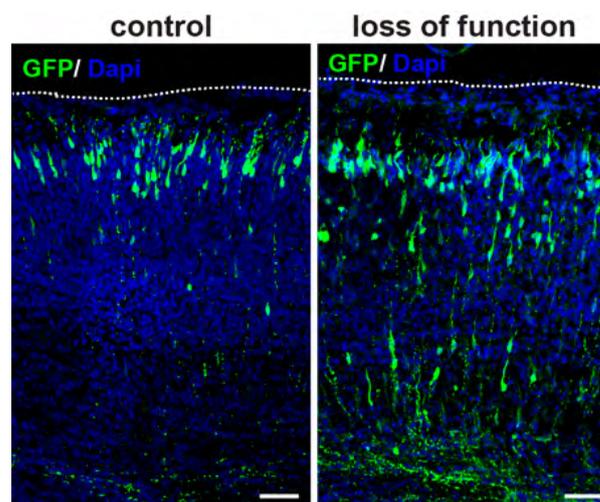
#### 1. La HTT normale et mutante régule le développement du cortex de la souris.

Au cours du développement cortical, les neurones de projection produits dans la zone ventriculaire subissent une transition multipolaire-bipolaire et migrent le long des fibres gliales pour atteindre leur destination finale où ils arrivent à maturité. Nous avons montré que la HTT régule la division des progéniteurs neuronaux puis la polarisation et la migration des neurones nouvellement générés. Il est intéressant de noter que l'altération de ces fonctions de la HTT dans des modèles murins de la maladie de Huntington a des conséquences sur le cerveau adulte avec notamment une diminution de l'épaisseur corticale.

#### 2. Le stress chronique supprime la neurogenèse de l'hippocampe adulte par une voie impliquant la HTT.

L'exposition chronique au stress est un facteur de risque majeur des troubles neuropsychiatriques. Une corticostérone plasmatique élevée (CORT) entraîne une réduction des taux du facteur neurotrophique BDNF et inhibe la neurogenèse hippocampique. En reconstituant un réseau cortico-hippocampique sur une puce, nous avons montré que la dexaméthasone (DXM), un agoniste des récepteurs glucocorticoïdes, réduit le transport vésiculaire du BDNF dans les axones corticaux. La DXM médie son effet par la phosphorylation de la HTT aux sérines 1181 et 1201 (S1181/1201) par la kinase CDK5, cyclin-dépendent kinase 5. La CORT induit une phosphorylation de la HTT sur les sérines S1181/1201 in vivo. L'absence constitutive de phosphorylation sur ces sérines chez la souris protège contre la diminution de la neurogenèse induite par le stress et prévient ainsi le comportement anxio-dépressif induit par la CORT.

Nos travaux ont donc permis de montrer que la HTT est importante pour la division et la maturation de cellules neuronales de différentes origines: les progéniteurs corticaux pendant le développement cérébral et les cellules de l'hippocampe lors de la neurogenèse adulte. Ces mécanismes sont altérés dans la maladie de Huntington.



**La huntingtine régule la migration pendant le développement cortical.**

Au stade embryonnaire E18.5, la majorité des neurones contrôles marqués à E14.5 par électroporation in utero (GFP) ont atteint les couches superficielles (gauche) alors que de nombreux neurones dépourvus de la HTT ne sont pas capables de le faire (droite). Barre d'échelle, 100 µm.

Crédit : © S Humbert/M Barnat.

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Barnat M, Le Fric J, Benstaali C and Humbert S (2017) Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology *Neuron* 93: 99.
- ▶ Lopes C, Aubert S, Bourgois-Rocha F, Barnat M, Rego AC, Deglon N, Perrier AL and Humbert S (2016) Dominant-Negative Effects of Adult-Onset Huntingtin Mutations Alter the Division of Human Embryonic Stem Cells-Derived Neural Cells *PLoS One* 11: e0148680.
- ▶ Molina-Calavita M, Barnat M, Elias S, Aparicio E, Piel M and Humbert S (2014) Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex *J Neurosci* 34: 10034.

**Le projet HUGE** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en octobre 2012 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 431 119 €.

**Partenaires :** Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie.

#### COORDINATRICE

**Sandrine Humbert** : sandrine.humbert@inserm.fr  
Institut Curie / Inserm

[https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/fr/recherche/equipes-de-recherche/equipe-progeniteurs-neuraux-et-pathologies-cerebrales--637944.htm?RH=NEUROFR\\_RECHEQUI](https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/fr/recherche/equipes-de-recherche/equipe-progeniteurs-neuraux-et-pathologies-cerebrales--637944.htm?RH=NEUROFR_RECHEQUI)

# HURIT

## Huntingtine et régulation du trafic intracellulaire

### — Rappel des objectifs

**Comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent l'efficacité du trafic intracellulaire dans les neurones : Focus sur la protéine huntingtine impliquée dans la maladie de Huntington.**

Le transport intracellulaire est un mécanisme cellulaire clé hautement régulé qui permet le transport sélectif de cargos à l'intérieur des cellules. Ce transport sélectif est essentiel pour réguler la signalisation, la survie des neurones.

Le but de ce projet était de mieux comprendre ces mécanismes fondamentaux en nous concentrant sur la protéine huntingtine (htt) dont le rôle de régulateur crucial du trafic intracellulaire est en train d'émerger. Notre laboratoire et d'autres ont montré que la htt, la protéine qui, lorsque mutée, cause la maladie de Huntington, contrôle le transport du facteur neurotrophique BDNF, et pourrait interagir avec l'enzyme GAPDH, une enzyme clé de la glycolyse. Nous avons cherché à comprendre la nature des sources énergétiques nécessaires pour promouvoir le transport dans les axones. Nous avons cherché à déterminer les mécanismes par lesquels la huntingtine et sa mutation altère les dynamiques intracellulaires. Enfin, nous avons cherché à déterminer comment des altérations du transport induisent un dysfonctionnement du réseau corticostriatal dans la MH par le développement de puces microfluidiques.

### — Résultats majeurs

**La glycolyse vésiculaire joue un rôle majeur dans la facilitation du transport axonal.**

Nous avons montré suite à des travaux antérieurs (Zala *et al.*, *Cell*, 2013) que la totalité de la glycolyse se trouve sur les vésicules et est nécessaire et suffisante pour promouvoir la motilité des vésicules in vitro et in vivo. Ces travaux montrent que la glycolyse vésiculaire est la machinerie minimale pour apporter l'énergie nécessaire au transport axonal (Hickelmann *et al.*, *Nat Comm*, 2016).

**La protéolyse de la Huntingtine dérégule la dynamique du réticulum endoplasmique.**

Nous avons montré que la protéolyse de la htt qui a lieu lors de la pathologie génère un fragment qui inactive la dynamine 1 et induit la mort des cellules via l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique. Ces résultats étendent les défauts de dynamiques intracellulaires induits par la htt mutante (El Daher *et al.*, *Embo J*, 2015).

**Reconstitution du circuit corticostriatal dans la maladie de Huntington sur puces microfluidiques.**

Grâce à l'approche microfluidique qui consiste à fabriquer dans un matériau biocompatible et transparent des chambres de culture et des canaux à l'échelle des cellules, les chercheurs ont pu contrôler la pousse et l'orientation des axones dans des canaux micrométriques pouvant atteindre jusqu'à 500 microns de longueur afin de reconstituer le circuit corticostriatal qui est altéré dans la MH. Cette étude a permis de montrer le rôle fondamental du transport du BDNF dans les axones corticaux et le rôle du cortex dans la genèse des dysfonctions au niveau du circuit entier (Virlogeux *et al.*, *Cell Reports*, 2018).

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ El-Daher MT, Hangan E, Bruyère J, Poizat G, Al-Ramah I, Pardo R, Bourg N, Souquere S, Mayet C, Pierron G, Lévêque-Fort S, Botas J, Humbert S, Saudou F. (2015) Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *EMBO J*. 2015 Jul 12. pii: e201490808.
- ▶ Hinckelmann MV, Virlogeux A, Niehage C, Poujol C, Choquet D, Hoflack B, Zala D and Saudou F. (2016) Self-propelling vesicles define glycolysis as the minimal energy machinery for neuronal transport *Nature Communications*, 7:13233. doi: 10.1038/ncomms13233.
- ▶ Virlogeux A, Moutaux E, Christaller W, Genoux A, Bruyère J, Fino E, Charlot B, Cazorla M, Saudou F. Reconstituting Corticostriatal Network On-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Reports*, Jan 2;22(1):110-122. doi: 10.1016/j.celrep. 2017.12.013.

Le projet HURIT est un projet Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheuses de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2013 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 465 938 €.

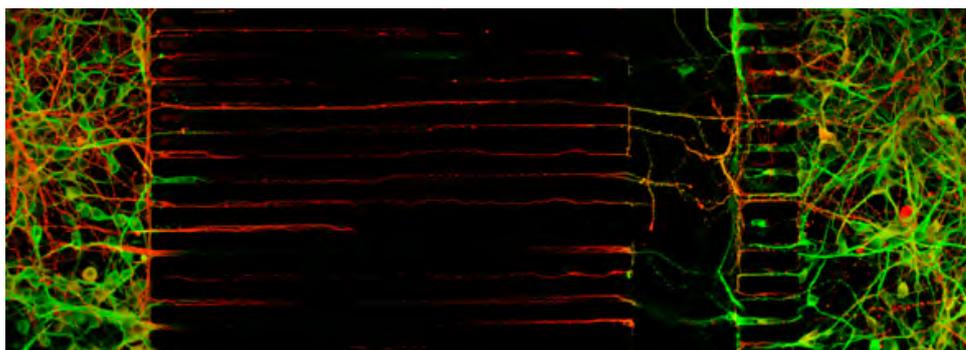
#### COORDINATEUR

**Frédéric Saudou** : frederic.saudou@inserm.fr

Institut Curie/ Inserm

[https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/en/research/research-teams/team-intracellular-dynamics-and-neurodegeneration--693724.htm?RH=NEUROEN\\_RECHEQUI](https://neurosciences.univ-grenoble-alpes.fr/en/research/research-teams/team-intracellular-dynamics-and-neurodegeneration--693724.htm?RH=NEUROEN_RECHEQUI)

Réseau neuronal de la maladie de Huntington dans une puce microfluidique. Les neurones de gauche étendent des prolongements appelés axones (en rouge) qui vont atteindre la chambre centrale. Les axones vont alors se connecter et former des synapses avec les dendrites (extensions plus courtes, en vert) provenant des neurones de droite et ainsi former un circuit neuronal fonctionnel. Ce circuit est atteint dans la maladie de Huntington. Crédit : © F. Saudou/M. Cazorla.



# ModelPolyQ

## Modèles avancés de maladies par expansion de polyglutamine (HD, SCA3, SCA7)

### — Rappel des objectifs

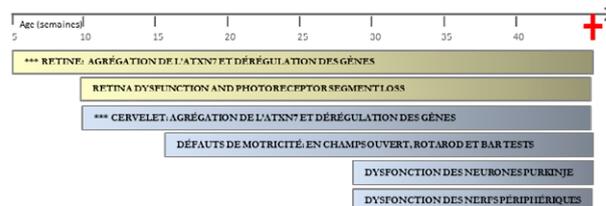
Les maladies à expansion de polyglutamine (polyQ) sont un groupe de neuf maladies neurodégénératives. Ces maladies neurologiques héréditaires sont dues à la répétition du codon CAG codant une séquence polyQ dans une protéine spécifique pour chaque maladie. Malgré d'importants progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes pathologiques de ces maladies, des thérapies efficaces font encore défaut. Les progrès dans ce domaine découleront d'études mécanistiques et précliniques qui dépendent de modèles de ces pathologies à la fois prédictifs et simple à mettre en place.

Le projet ModelpolyQ se concentre sur trois troubles neurologiques à polyQ : La maladie de Huntington (HD), les ataxies spinocérébelleuses de type 3 (SCA3) et de type 7 (SCA7). L'objectif est de produire de nouveaux modèles de ces trois maladies qui seront comparés aux modèles existant et de développer des procédures standardisées pour l'étude des mécanismes pathologiques communs à ces trois maladies à polyQ. ModelpolyQ se focalise sur le développement de deux types de modèles innovants, ceux basés sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPS) de patient (modèle *in cellulo*) et ceux basés sur l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés.

### — Résultats majeurs

**Modèles *in vivo* de SCA7 :** L'expansion de polyQ dans l'ATXN7 mène progressivement à des altérations de motricité (l'ataxie) et une cécité chez les patients SCA7. ModelpolyQ a établi un nouveau modèle souris SCA7 et déterminé la séquence des anomalies moléculaires, histologiques, fonctionnelles et comportementales caractérisant les défauts de motricité et de vision chez la souris. Ces phénotypes sont robustes, reproductibles dans différents laboratoires et pourront ainsi servir à développer des stratégies thérapeutiques pour SCA7 (manuscrit en préparation). Par ailleurs, pour élucider la fonction normale de l'ATXN7, ModelpolyQ a étudié les conséquences de son inactivation chez le poisson zèbre et découvert que l'ATXN7 joue un rôle essentiel dans la différenciation des photorécepteurs de l'œil -une des cibles principales de SCA7- suggérant que ce rôle serait altéré par l'expansion de polyQ de l'ATXN7 (Carrillo-Rosas *et al.* 2018). De plus, la délétion de l'ATXN7 chez le poisson entraîne un colobome oculaire, une malformation structurelle responsable de la déficience visuelle chez les nouveaux nés.

**Modèle *in cellulo* humain de HD pour l'évaluation de produit de thérapie génique :** Le consortium ModelpolyQ a développé un modèle cellulaire de neurones striataux dérivés de cellules iPS de patients HD, qui a permis de tester deux types de thérapie génique. Une première approche par ARN interférence ciblant les ARN messenger du gène HTT a été évaluée. Le niveau de réduction de l'expression de la HTT, la spécificité du ciblage et les conséquences transcriptionnelles de ce vecteur de thérapie génique ont été mesurés dans des neurones humains dérivés de cellules iPS de patient (Cambon *et al.* 2017). ModelpolyQ a également développé une nouvelle approche de thérapie génique de HD par édition du gène HTT en utilisant la technologie CRISPR-Cas9 (Merienne *et al.* 2017). L'originalité de cette approche est le développement d'une stratégie permettant de désactiver l'enzyme CRISPR-Cas9 après l'édition du gène HTT. Ce système permet de réduire les effets indésirables d'une activation prolongée de l'enzyme CRISPR/Cas9 tels que l'édition non spécifique de gènes autres que la HTT ou le déclenchement d'une réaction immunitaire.



Début et progression des altérations phénotypiques des souris SCA7. La figure montre qu'une atteinte de la rétine (en vert), responsable des défauts visuels de la souris, précède une atteinte du cervelet et des défauts de motricité (en bleu). Aussi, des défauts moléculaires (\*\*\*) précèdent des atteintes fonctionnelles, comportementales et histologiques. Les souris SCA7 décèdent prématurément à environ 1 an. Crédit : © DR.

### Modèle *in cellulo* humain de HD pour le criblage à haut débit de nouveaux médicaments :

ModelpolyQ a exploité le modèle cellulaire de neurones striataux dérivés de cellules iPS de patients HD pour identifier de nouvelles molécules capables de diminuer le niveau de HTT mutante dans les cellules cérébrales de patient. ModelpolyQ a développé un test de criblage et établit la pertinence de cette approche en criblant avec succès une chimiothèque de repositionnement de médicaments déjà sur le marché.

### — Production scientifique et valorisation

- S. Carrillo-Rosas *et al.*, Hum Mol Genet , 28 (6), 912-927 2019 Mar 15 DOI: 10.1093/hmg/ddy401s: 15
- Niewiadomska-Cimicka A, Trottier Y. Neurotherapeutics. 2019 Aug 20. doi: 10.1007/s13311-019-00778-5.
- Cambon K *et al.*, Mol Ther Methods Clin Dev. 2017 May 11;5:259-276. doi: 10.1016/j.omtm.2017.05.001. eCollection 2017 Jun 16.
- Merienne N *et al.*, Cell Rep. 2017 Sep 19;20(12):2980-2991. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.075.
- B. Baldo *et al.*, eNeuro. 2018 Jul-Aug; 5(4): ENEURO.0234-18.2018. Doi: 10.1523/ENEURO.0234-18.2018.

**Le projet ModelpolyQ** est un projet collaboratif international de recherche translationnelle. Le projet a commencé en octobre 2015 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 479 912 €.

**Partenaires :** Inserm/UEVE U861, I-Stem (Evry, France), IGBMC/CNRS/INSERM/UNISTRA (Illkirch, France), University of Tuebingen (Allemagne), Lausanne University Hospital - CHUV (Suisse), University of Milan (Italie).

#### COORDINATEUR

**Luís Pereira de Almeida**  
University of Coimbra (Portugal)  
<http://www.uc.pt/en/iii/ModelPolyQ/project>



# Démences Fronto-Temporales

MAD CHMP2B

p. 101

RiMOD-FTD

p. 102

ToFU

p. 103

## MAD CHMP2B

## Pathogenèse des démences fronto-temporales : effets post-synaptiques de la protéine CHMP2B

## — Rappel des objectifs

**Démence fronto-temporale et protéine CHMP2B**

Démence la plus prévalente après la maladie d'Alzheimer, la démence fronto-temporale (DFT) provient d'une dégénérescence de neurones du cortex cérébral, dont les causes ne sont que très partiellement élucidées, notamment à cause de l'hétérogénéité de ses caractéristiques biochimiques et génétiques. L'une des formes familiales de DFT est due à une mutation pathogène de la protéine CHMP2B (Charged Multivesicular body Protein 2B). Celle-ci appartient à un complexe supra-moléculaire appelé ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III), capable au sein des cellules de remodeler localement la membrane périphérique ou celle de compartiments internes (endo-lysosomes). Ces propriétés nous ont menés à l'hypothèse que la CHMP2B pouvait jouer, via ESCRT-III, un rôle inédit dans les épines dendritiques (partie post-synaptique des synapses excitatrices), rôle qui serait perturbé par la mutation pathogène dans une phase précoce de la DFT. Nos objectifs étaient donc de caractériser les effets de CHMP2B (normal et mutant) sur la structure et la fonction des épines post-synaptiques, en corrélation avec les interactions moléculaires entre CHMP2B, ESCRT-III, et les protéines synaptiques.

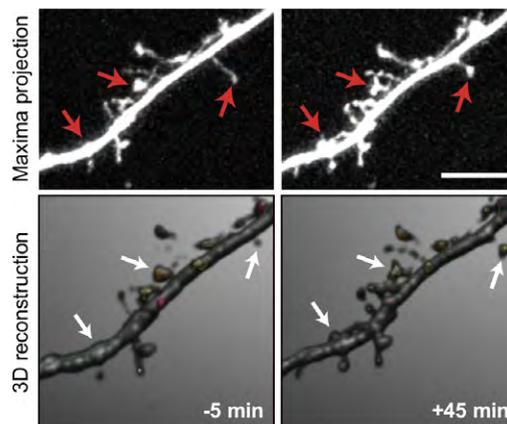
## — Résultats majeurs

**Une fonction synaptique pour CHMP2B**

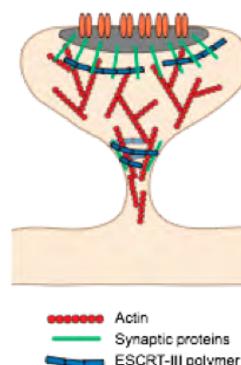
Nous avons découvert qu'au sein des synapses, la protéine CHMP2B était liée à une forme stabilisée du complexe ESCRT-III, associée au cytosquelette post-synaptique et à des récepteurs NMDA (NR2B). La CHMP2B se concentrait sous la surface des épines dendritiques, autour de la densité post-synaptique (structure de support des récepteurs). Nous avons montré que le complexe CHMP2B / ESCRT-III jouait un rôle indispensable dans le maintien de dendrites complexes et dans la maturation et la plasticité des synapses excitatrices. L'extinction (par shRNA) de CHMP2B normale entraînait un phénotype dendritique comparable à celui induit par l'expression du mutant pathogène. De plus, le complexe ESCRT-III synaptique contenait la protéine Alix, activatrice connue d'ESCRT-III. L'utilisation de souris KO a indiqué qu'Alix était indispensable au développement des prolongements neuronaux dans le cerveau. Le complexe CHMP2B / ESCRT-III pourrait contribuer directement à structurer et compartimenter la membrane de l'épine dendritique, affectant notamment la diffusion de récepteurs synaptiques.

## — Production scientifique et valorisation

- ▶ Chassefeyre, R., Hernandez, M.J., Bertaso, F., Bouquier, N., Blot, B., Martinelli, N., Weissenhorn, W., Sadoul, R., Fagni, L., Goldberg, Y., 2012. Effects of the frontotemporal dementia-associated Charged Multivesicular Protein 2B (CHMP2B) on dendritic spines. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 33, 65–66.
- ▶ Chassefeyre, R., Martinez-Hernandez, J., Bertaso, F., Bouquier, N., Blot, B., Laporte, M., Fraboulet, S., Coute, Y., Devoy, A., Isaacs, A.M., Pernet-Gallay, K., Sadoul, R., Fagni, L., Goldberg, Y., 2015. Regulation of Postsynaptic Function by the Dementia-Related ESCRT-III Subunit CHMP2B. *Journal of Neuroscience* 35, 3155–3173.
- ▶ Laporte, M.H., Chatellard, C., Vauchez, V., Hemming, F.J., Deloulme, J.-C., Vossier, F., Blot, B., Fraboulet, S., Sadoul, R., 2017. Alix is required during development for normal growth of the mouse brain. *Scientific Reports* 7, 1–16.



Dendrite d'un neurone *in vitro*, avant (-5 min) et après (+45 min) une courte stimulation des récepteurs NMDA synaptiques. Au-dessus : microscopie de fluorescence (longueur de la barre : 15  $\mu$ m). Au dessous : reconstructions en 3D. Les protubérances indiquées par des flèches sont des épines dendritiques agrandies suite au renforcement synaptique induit par la stimulation. Ce phénomène nécessite la présence de la protéine CHMP2B. Voir R. Chassefeyre *et al.*, 2015, *J. Neuroscience* 35, 3155–3173.



Ci-contre : schéma de la configuration proposée pour ESCRT-III (filaments bleus) au sein des épines. Crédit : © DR.

- ▶ Mercier, V., Laporte, M.H., Destaing, O., Blot, B., Blouin, C.M., Pernet-Gallay, K., Chatellard, C., Saoudi, Y., Albiges-Rizo, C., Lamaze, C., Fraboulet, S., Petiot, A., Sadoul, R., 2016. ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis and signaling. *Scientific Reports* 6, 1–15.
- ▶ Sadoul, R., Laporte, M.H., Chassefeyre, R., Chi, K.I., Goldberg, Y., Chatellard, C., Hemming, F.J., Fraboulet, S., 2018. The role of ESCRT during development and functioning of the nervous system. Seminars in Cell & Developmental Biology, *The multiple facets of the ESCRT machinery* 74, 40–49.

**Le projet MAD CHMP2B** est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en novembre 2011 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 500 000 €.

**Partenaires** : Inserm Institute for Advanced Biosciences CRI U823, CNRS, Institut de Génétique Fonctionnelle.

**COORDINATEUR**

**Yves Goldberg** : yves.goldberg@univ-grenoble-alpes.fr  
Inserm Grenoble Institut des Neurosciences CRI U836

# RiMOD-FTD

## Risk and Modifying factors in Fronto Temporal Dementia

### — State of the art and scientific aims

Fronto-Temporal-Dementia (FTD) is a devastating progressive early onset dementia with a strong genetic influence. Currently, seven genes have been identified but how they lead to a very similar clinical phenotype is still an unanswered question. Currently, there is no cure for FTD. We need to determine whether a common target for a single therapy can be identified that can be applied to all patients or whether distinct genetic, clinical and pathological subgroups each need specific treatments. We therefore investigated common and distinctly affected processes in different groups of FTD patients using a combination of genetic, genomic and cell biological approaches.

### — Main Results

We identified new candidate genes for FTD and pathways common for all patients groups and pathways corresponding to specific genetic mutations or neuropathological characteristics. For several new candidate genes we obtained evidence from our multi-omic characterization of human, mouse and iPSC based multi-omics data and they are being investigated in our cellular and animal models.

The RiMod-FTD project has generated a wealth of data and the further integration with genome-wide functional experiments for the key pathways of FTD will allow us to interpret genetic mutations and expression changes to the core upstream mechanisms and prioritize genes for detailed functional analysis.

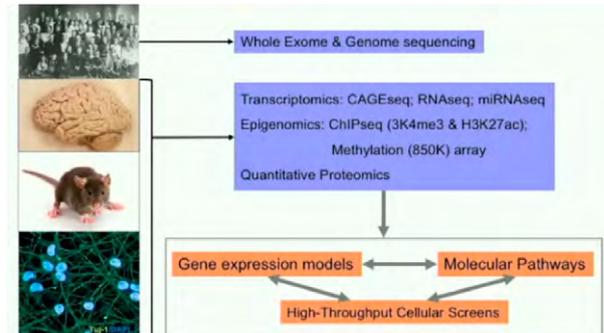
The data is being used to elucidate how pathogenic mutations and altered gene expression converge towards common pathways in FTD and allow us to refine our current theoretical disease models so that our findings have immediate translational impact.

### — Scientific outcomes

We generated a RiMOD-FTD data warehouse at the DZNE ownCloud. We are building an integrated data platform funded by the BMBF IDSN project. Variant data and RNAseq data will be deposited in public data repositories upon publication as far as permitted by the EU General Data Protection Regulation (GDPR).

#### Publications:

- ▶ Andersson, R. *et al.*, (2014) Nat Commun. Nov 12;5:5336.
- ▶ Appocher C. *et al.*, (2017) Nucleic Acids Research, 45:8026-804.
- ▶ Arner E. *et al.*, FANTUM consortium, (2015) Science, Feb 27;347 (6225):1010-4.
- ▶ Beel S. *et al.*, (2017) Human Molecular Genetics, 26 (15), 2850-2863.
- ▶ Blauwendraat C. *et al.*, (2016) Genome Med., Jun 10, 8 (1) :65.
- ▶ Bento-Abreu A. *et al.*, (2018). Human Molecular Genetics, 27 (7), 1276.
- ▶ Blauwendraat C *et al.*, (2016) . Neurobiol Aging. Jan;37:208.e11-7.
- ▶ Budini M. *et al.*, (2015) Hum Mol Genet., 24:9-20.
- ▶ Dardis A. *et al.*, (2016) Acta Neuropathologica Communications, 4: 52.
- ▶ De Conti L. *et al.*, (2015) Nucleic Acids Research, 43: 8990-9005.
- ▶ Dislich B *et al.*, (2015) Mol Cell Proteomics 14, 2550-2563.
- ▶ Ferrari R *et al.*, (2016) Mol Neurodegener. Feb 24;11:21.
- ▶ Gaweda-Walerych K. *et al.*, (2016) Neurobiology of Aging, 47: 127-138.
- ▶ Guo W. *et al.*, (2017) Nature Commun, 8 (1), 861.



Using a range of genomic approaches we have studied the genetic subtypes of FTD: MAPT, GRN, C9ORF72 mutation carriers, sporadic cases and carriers of new genes that were identified using post-mortem brain material. These samples were complemented with mouse brain tissue of matching models at different time points and human and mouse derived iPSC in undifferentiated and differentiated state. Crédit : © DR.

- ▶ Kerimoglu C *et al.*, (2017) Cell Rep. Jul 18;20(3):538-548.
- ▶ Kuhn PH *et al.*, (2015) Mol Cell Proteomics 14, 1584-1592
- ▶ Laurent SA *et al.*, (2015) Nat Commun. 6, 7333.
- ▶ Li S *et al.*, (2015). J Immunol 195, 4244-4256.
- ▶ Mihevc S.P. *et al.*, (2016) Scientific Reports, 6: 33996.
- ▶ Mishra A *et al.*, (2017). Brain, 140 1437-1446.
- ▶ Mohagheghi F. *et al.*, (2015) Human Molecular Genetics, 25: 534-545.
- ▶ Mompeán M. *et al.*, (2016) Frontiers in Molecular Neuroscience, 9: 125.
- ▶ Mompeán M. *et al.*, (2016) PLOS Biology, 14: e1002447
- ▶ Mompeán M. *et al.*, (2015) Chemistry Letters, 6: 2608-2615.
- ▶ Mompeán M. *et al.*, (2017) Journal of Biological Chemistry, 292:11992-12006.
- ▶ Mompeán M. *et al.*, (2016) FEBS Journal, 283: 1242-1260.
- ▶ Poesen K. *et al.*, (2017) Neurology, 88 (24).
- ▶ Ratti A. and Buratti E. (2016) J Neurochem, 138 Suppl, 1: 95-111.
- ▶ Rizzu P *et al.*, (2016) Acta Neuropathol Commun. Apr 14;4(1):37.
- ▶ Saftig P, Lichtenthaler SF (2015). Prog Neurobiol 135, 1-20.
- ▶ Schulz AM *et al.*, (2015) J Cell Biol 211, 553-567.

#### Reviews:

- ▶ Buratti E. (2015) Advances in Genetics, 91: 1-53.
- ▶ Spalloni A, Longone P. (2015) Neurosci Biobehav Rev. Nov 19;60:12-25.
- ▶ Van Damme P. *et al.*, (2017) Disease Models and Mechanisms, 10 (5), 537-549.

**Le projet RiMOD-FTD est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en mars 2014 et a duré 46 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 312 000 €.**

**Partenaires :** University College London (Royaume-Uni), Erasmus University Medical Center (Pays-Bas), Santa Lucia Foundation (Italie), Vesalius Research Center (Belgique), Copenhagen University (Danemark), University of Göttingen (Allemagne), Technical University Munich (Allemagne), Inserm UMR-S1127 / ICM.

#### COORDINATEUR

**Prof. dr. Peter Heutink :** German Center For Neurodegenerative Diseases- Tuebingen (Allemagne)  
<https://www.dzne.de/en/research/research-areas/fundamental-research/research-groups/heutink/research-areasfocus/>

# Interactions between TAU, FUS and TDP-43 in neurodegenerative diseases

## — Rappel des objectifs

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales avec un risque de 1/1000 sur l'ensemble de la vie. Ces maladies sont toutes deux de très mauvais pronostic, et les options thérapeutiques restent très limitées. La SLA et la DFT sont parfois familiales et elles peuvent survenir dans les mêmes familles et être causées par des mutations dans les mêmes gènes.

Chez les patients SLA et DFT, trois types d'inclusions protéiques mutuellement exclusives sont principalement observées, et sont immuno-réactives pour les protéines TDP-43 (protéinopathie TDP-43), TAU (TAUopathie) ou FUS (FUSopathie). Des mutations dans les gènes codant pour TDP-43 et FUS sont associées à des formes familiales de SLA, tandis que des mutations de TAU sont associées à des cas familiaux de DFT. Les données anatomopathologiques et génétiques convergent donc pour attribuer un rôle central à ces trois protéines dans la pathogénèse de la SLA et de la DFT.

TDP-43 et FUS sont des protéines de liaison à l'ARN, qui régulent les différentes étapes du métabolisme de l'ARN, de la transcription au transport subcellulaire. Il est connu que les mutations de FUS provoquent une délocalisation de la protéine, essentiellement nucléaire, vers le cytoplasme. TAU est une protéine du cytosquelette, qui régule la structure des microtubules. Des données précédentes ont déjà démontré que TDP-43 et FUS faisaient partie d'une même voie pathogénique. De façon intéressante, l'épissage de l'ARNm de TAU est régulé par FUS, et une perte de fonction de FUS augmente l'inclusion de l'exon 10, mimant l'effet de certaines mutations familiales de TAU associées à la DFT. Par ailleurs, une étude protéomique récente a suggéré une interaction directe TAU et FUS. FUS et TAU pourraient donc interagir dans une même voie génétique, mais l'importance éventuelle de ces relations sur la progression de la SLA/DFT reste totalement inconnue.

### Objectifs :

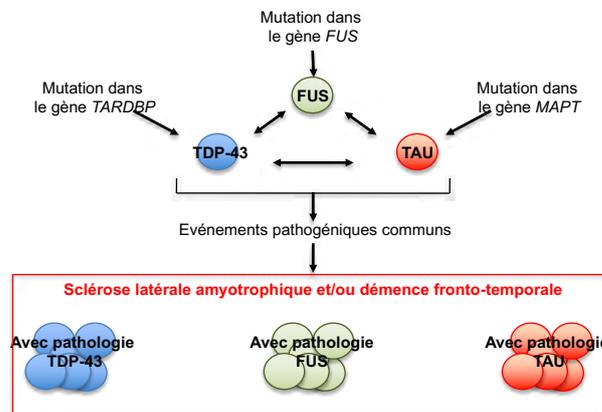
Au cours de ce projet, nous étudions les interactions génétiques entre TAU et les protéines de liaison à l'ARN associées à la SLA/DFT grâce à deux organismes modèles, la souris et le poisson zèbre. L'interaction entre TAU et FUS étant plus documentée, nous nous focalisons principalement sur celle-ci.

Nous répondrons aux questions suivantes :

- 1) La délocalisation de FUS dans le cytoplasme, telle qu'elle a lieu au cours de la SLA liée à FUS, altère-t-elle le métabolisme de TAU et provoque-t-elle des symptômes de DFT ?
- 2) Les TAUopathies sont-elles associées à des modifications de fonction de FUS et/ou de TDP-43 ?
- 3) TAU contribue-t-il à la neurodégénérescence causée par les mutations de TDP-43, FUS ou d'autres protéines de liaison à l'ARN ? La réalisation de ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces deux maladies, grâce à des approches de transgénèse modernes et proches de la situation génétique chez l'homme. Notre objectif principal est de dégager un schéma cohérent sur la pathogénèse de ces maladies en unifiant des causes actuellement considérées comme disparates.

## — Résultats majeurs

Le projet est actuellement encore en cours, et nous avons franchi plusieurs étapes majeures. Nous avons notamment mis au point et validé le nouveau modèle conditionnel murin FUS, ainsi que



Crédit : © DR.

plusieurs modèles de poisson zèbre. Nous avons collecté les données d'interaction génétique entre FUS et TAU. Les résultats sont en cours de finalisation.

## — Production scientifique et valorisation

Nous finalisons actuellement plusieurs manuscrits directement issus de ToFU.

- Picchiarelli G, Demestre M, Zuko A, Been M, Higelin J, Dieterlé S, Goy MA, Mallik M, Sellier C, Scekcic-Zahirovic J, Zhang L, Rosenbohm A, Sijlmans C, Aly A, Mersmann S, Sanjuan-Ruiz I, Hübers A, Messaddeq N, Wagner M, van Bakel N, Boutilier AL, Ludolph A, Lagier-Tourenne C, Boeckers TM#, Dupuis L#, Storkebaum E#. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2019 Nov;22(11):1793-1805. # co-senior authors.
- Boutilier AL, Tzeplaff L, Dupuis L. The dark side of HDAC inhibition in ALS. *EBioMedicine*. 2019 Mar;41:38-39.
- Vercauysse P, Vieau D, Blum D, Petersén Å, Dupuis L. Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jan 19;11:2. doi: 10.3389/fnmol.2018.00002.
- Scekcic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, Allmeroth K, Dieterlé S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, René F, Dormann D, Haass C, Ludolph AC, Lagier-Tourenne C, Storkebaum E, Dupuis L. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2017 Jun;133(6):887-906.

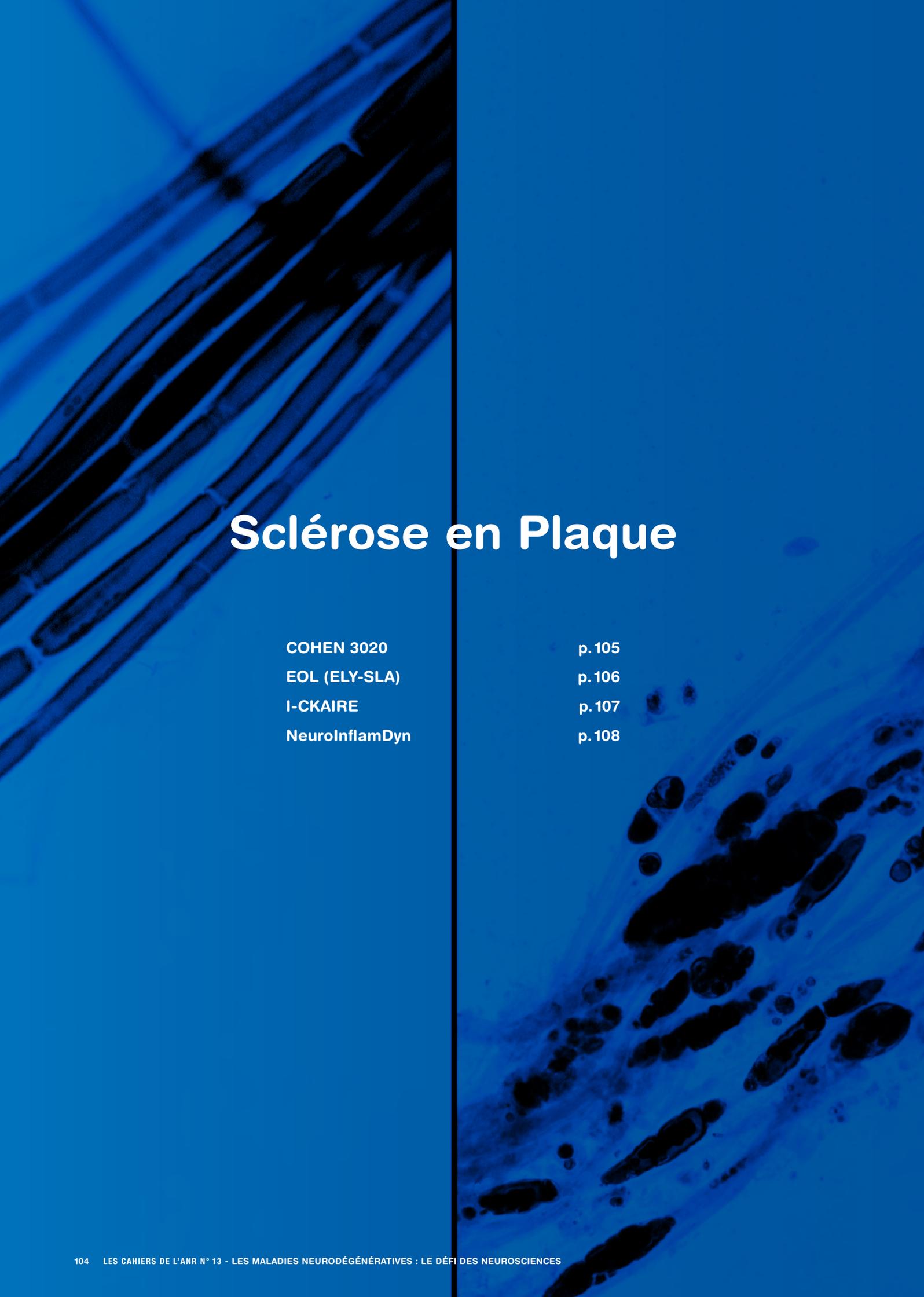
**Le projet ToFU est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2017 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 679 980 €.**

**Partenaires :** Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert UMR-S1172, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S1127.

### COORDINATEUR

**Luc Dupuis :** [ldupuis@unistra.fr](mailto:ldupuis@unistra.fr)

Inserm UMR-S1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence



# Sclérose en Plaque

COHEN 3020

p. 105

EOL (ELY-SLA)

p. 106

I-CKAIRE

p. 107

NeuroInflamDyn

p. 108

## COEN 3020

# BAFF/APRIL in the central nervous system

### — State of the art and scientific aims

Two clinical trials in neurodegenerative diseases, multiple sclerosis and optica neuritis, aimed at antagonizing the two B-cell targeting molecules, BAFF and APRIL, showed a clear positive biological response with a profound B-cell reduction but an unfortunate negative clinical response with an exacerbation of the disease. These trials revealed a neuroprotective role for BAFF and/or APRIL. The “inside of the box” thinking part of this project was to postulate the presence of regulatory B cells dependent on BAFF and/or APRIL. The “outside of the box” thinking part of this project was to postulate that BAFF and/or APRIL act on non-immune brain resident cells to mediate a neuroprotective action.

### — Main results

We have shown that APRIL is expressed in lesions from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS. In its absence, the disease was worst. Lesions from MS patients also showed APRIL expression upon infiltration of macrophages. Notably, all the APRIL secreted by these macrophages specifically targeted astrocytes, arguing in favor of the “outside of the box” hypothesis. The upregulation of chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), binding to APRIL, in reactive astrocytes explained the latter selectivity. Astrocytes responded to APRIL by producing sufficient amount of IL-10 to dampen antigen-specific T-cell proliferation and pathogenic cytokine secretion. Finally, delivery either intraspinal or intravenous of recombinant APRIL significantly delayed/reduced symptoms in EAE mice. Taken together, our data show that APRIL mediates an anti-inflammatory response from astrocytes in MS lesions. This protective activity is not shared with BAFF. Notably, the finding that APRIL is a new ligand of CSPG in the central nervous system opens new perspective for the use of recombinant APRIL to counteract the inhibitory role played by CSPG on the regeneration process during brain injury.

### — Scientific outcomes

Peer-reviewed articles:

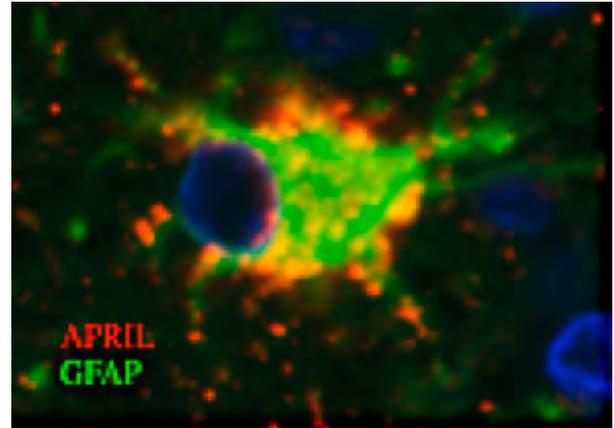
- ▶ L. Baert, M. Benkhoucha, N. Popa, M. C. Ahmed, B. Manfroi, J. Boutonnat, N. Sturm, G. Raguenez, M. Tessier, O. Casez, R. Marignier, M. Ahmadi, A. Broisat, C. Ghezzi, C. Rivat, C. Sonrier, M. Hahne, D. Baeten, R. R. Vives, H. Lortat-Jacob, P. N. Marche, P. Schneider, H. P. Lassmann, J. Boucraut, P. H. Lalive, B. Huard, A proliferation-inducing ligand-mediated anti-inflammatory response of astrocytes in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 2019.
- ▶ C. M. Fehres, N. O. van Uden, N. G. Yeremenko, L. Fernandez, G. Franco Salinas, L. M. van Duivenvoorde, B. Huard, J. Morel, H. Spits, M. Hahne, D. L. P. Baeten, APRIL Induces a Novel Subset of IgA+ Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1, *Front Immunol* 2019.

Reviews:

- ▶ L. Baert, B. Manfroi, O. Casez, N. Sturm, B. Huard, The role of APRIL - A proliferation inducing ligand - In autoimmune diseases and expectations from its targeting, *J. Autoimmun.* 2018.

Patent :

- ▶ 2014 Huard B, Lalive P., University Grenoble-Alpes and University of Geneva: New pharmaceutical compositions and their use for the treatment of autoimmune diseases. EP14305362.7 (March, 2014)



Binding of APRIL onto a GFAP<sup>+</sup> reactive astrocyte in lesions from multiple sclerosis. Crédit : © Bertrand HUARD.

**Le projet COEN 3020** est un projet collaboratif international de recherche translationnelle. Le projet a commencé en juin 2016 et a duré 43 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 206 833 €.

**Partenaires :** Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Germany.

#### COORDINATEUR

**Bertrand Huard** : bertrand.huard@univ-grenoble-alpes.fr  
Institut Albert Bonniot - Université Grenoble Alpes

## EOL (ELY-SLA)

# Étude de faisabilité et de sécurité d'emploi du dispositif d'écriture avec les yeux chez des sujets atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (Étude ELY-SLA)

### — Rappel des objectifs

Le projet ELY-SLA visait à évaluer si des personnes atteintes de SLA seraient en mesure d'acquérir la maîtrise d'un dispositif d'écriture avec le regard, appelé EOL (Eye-On-Line). Les personnes atteintes de SLA perdent progressivement l'usage de leurs membres, de leurs mains et de la parole, tout en conservant pour certains des compétences cognitives intactes. En particulier, les mouvements oculaires sont souvent épargnés par la maladie, offrant ainsi une voie pour le développement d'activités motrices volontaires.

Dix-huit patients ont été entraînés à l'usage du dispositif pendant 5 séances d'une heure, avec l'objectif qu'au terme de l'entraînement une majorité des sujets puissent écrire des traces (chiffres) avec les yeux, reconnaissables par un tiers.

### Écrire en cursive avec le regard

Le dispositif EOL repose sur l'observation qu'un stimulus visuel constitué de disques papillotants et statiques peut s'accompagner de la perception d'une illusion visuelle produite par les mouvements des yeux. Lorsque c'est le cas, le stimulus donne l'impression de se déplacer avec le regard, offrant un support mobile sur lequel il est possible de réaliser des mouvements de poursuite lisse à volonté, dans toutes les directions. Maîtriser la boucle mouvement des yeux/génération de poursuite lisse demande souvent un apprentissage comportant 3 étapes :

- Percevoir l'illusion de mouvement induite par le mouvement des yeux lors de l'observation du stimulus inducteur présenté sur un écran ;
- Générer à volonté des mouvements de poursuite oculaire lisse en s'appuyant sur cette illusion visuelle de mouvement ;
- Projeter le plan moteur de l'écriture, appris à l'école pendant de longues années, sur les muscles oculomoteurs, de façon à générer des chiffres, des lettres, des mots et des dessins avec la poursuite oculaire lisse.

### — Résultats majeurs

Après des séances d'initiation et de familiarisation, il était demandé aux sujets d'écrire les chiffres avec les yeux. La qualité de leur production a été évaluée par un test de lecture de ces chiffres par des personnes extérieures (N=18) et n'ayant pas suivi d'entraînement. Le score de reconnaissance de chaque sujet a été utilisé comme mesure du succès de l'apprentissage.

Les résultats obtenus par les patients sont très comparables à ceux des sujets sains. Les comparaisons quantitatives sont cependant difficiles, à la fois parce que le nombre de sujets est faible, qu'ils ne sont pas appariés, et que le lieu de test et le déroulement des sessions n'ont pas strictement les mêmes. Malgré ces limitations, le pattern général est le même : des patients ayant facilement appris à écrire des chiffres avec les yeux, des patients ayant rencontré des difficultés, mais réalisant des progrès constants, et des patients n'ayant pas ou peu progressé. Chacun de ces « groupes » représente environ 30 % des sujets, répartition semblable à celle observée pour les sujets sains. Le taux de reconnaissance des chiffres écrits par les patients est de 80 % et a une distribution similaire à celle de sujets sains. Les algorithmes d'analyse automatique des traces, utilisant le modèle bayésien ont été adaptés et testés sur des alphabets écrits avec les yeux. Ces alphabets écrits par des sujets entraînés ont permis de montrer que la reconnaissance automatique était fiable et permettait de reconnaître le scripteur qui avait écrit ces alphabets.

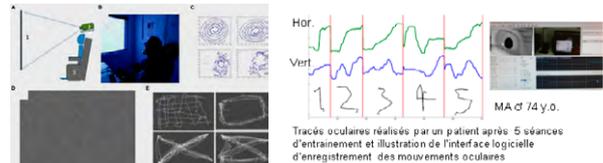


Figure 1 : Illustration du dispositif EOL et exemples de figures réalisées avec le regard par les patients. Exemples de tracés oculaires réalisés par un patient après entraînement

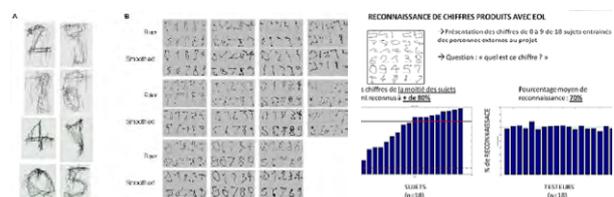


Figure 2 : Exemples de chiffres écrits avec le regard et résultats d'un test de lisibilité de chiffres oculo-écrits par des patients SLA après 5 séances d'entraînement. Le pourcentage de chiffres reconnus varie beaucoup d'un sujet à l'autre et est en moyenne de 80 %. Les résultats ne dépendent pas des testeurs. Crédit : © DR.

Cette modélisation indique qu'il est possible de traduire directement l'écriture avec les yeux en caractères imprimés, et de savoir qui a écrit.

ELY-SLA a démontré l'innocuité et la faisabilité d'un apprentissage avec le système EOL. La plupart des patients atteints de SLA pouvaient apprendre à utiliser ce système, et obtenaient des résultats comparables à ceux de sujets sains. Ceci indique que le système oculomoteur des patients reste fonctionnel. Malgré ces résultats encourageants, il reste qu'une partie des participants échouent à maîtriser le dispositif, sans que l'on ait une explication des origines de ces différences interindividuelles.

### — Production scientifique et valorisation

Publications :

- M. Chanceaux *et al.*, 36th Annual Conference of the Cognitive Science Society, Jul 2014, Québec, pp.2014–2019.
- Lenglet, T. *et al.*, (2019). *Frontiers in neuroscience*, 13, 538.
- Diard, J. *et al.*, *Frontiers in psychology*, 4, 843.
- Lenglet, T. *et al.*, (2016). *European Journal of Neurology*, 23.

Brevets/valorisation :

- Lorenceau, J. *System comprising an oculometer, method implemented on such a system and corresponding computer program product*. U.S. Patent No 14/122,412, 2014.

**Le projet EOL (ELY-SLA) est un projet collaboratif public-privé de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2013 et a duré 33 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 402 701 €.**

**Partenaires :** AP-HP – Hôp. Pitié-Salpêtrière, LNCP (Grenoble), Pertech (Mulhouse).

#### COORDINATEUR

**Jean Lorenceau** : [jean.lorenceau@upmc.fr](mailto:jean.lorenceau@upmc.fr)  
CNRS Paris  
<http://eol.scicog.fr/actualites/actualite.html>

## I-CKAIRE

## Inhibiteurs des récepteurs de chimiokines comme agents anti-inflammatoires dans les pathologies oculaires

## — Rappel des objectifs

**I-CKAIRE : contrôler l'inflammation dans la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)**

La DMLA est la maladie neuro-dégénérative qui est la première cause de cécité chez les personnes âgées. Sa prévalence serait actuellement de 5 % dans la population générale et de plus 10 % pour les personnes âgées de plus de 55 ans. Les thérapies actuelles ne traitent pas l'aspect neuro-dégénératif de la pathologie, mais seulement les symptômes angiogéniques. Il y a donc urgence à développer de nouvelles thérapies ciblant les causes de la DMLA.

Des études récentes montrent que certains médiateurs de la réponse inflammatoire sont impliqués dans la pathogénèse de la DMLA, sous ses deux formes humide et sèche. Il s'agit notamment des cytokines chimiotactiques appelées chimiokines. Ainsi, notre équipe avait précédemment montré que les récepteurs de chimiokine CX3CR1 et CCR2 sont des médiateurs centraux de la pathologie aussi bien chez l'homme que chez la souris. Cependant, leur rôle précis dans le développement de la DMLA restait inconnu. A partir d'un concept original d'inhibition allostérique, nous avons identifié un peptide de 7 résidus appelé ECL1i qui a une forte activité antagoniste sur CCR2. Les grands objectifs de notre projet consistaient à (i) optimiser ce peptide, (ii) déterminer la pharmacodynamique *in vivo* d'un peptide « chef de file » et (iii) de le tester dans des modèles murins de dégénérescence rétinienne.

## — Résultats majeurs

**I-CKAIRE : limiter l'infiltration monocytaire en contrôlant les chimiokines inflammatoires**

Dans un premier travail (1), nous avons montré que la DMLA est associée, chez les patients, à une augmentation des niveaux intraoculaire de la chimiokine CCL2 et à une infiltration sous-rétinienne de monocytes inflammatoires exprimant le récepteur CCR2. Dans divers modèles murins, nous avons montré que les macrophages sous-rétiniens produisent le CCL2 et entraîne le recrutement de monocytes, l'accumulation de macrophages et la dégénérescence des photorécepteurs *in vivo*. Nos données suggèrent que le blocage de l'inflammation en inhibant l'axe CCR2/CCL2 serait un outil puissant de contrôle du développement de la DMLA.

Nous avons montré que le peptide ECL1i présente une activité sélective d'inhibition de la migration dépendante de CCR2, sans affecter d'autres fonctions. Dans des modèles murins, un traitement avec ECL1i limite le recrutement de monocytes et le développement de deux maladies inflammatoires, l'une aiguë comme

la péritonite et l'autre chronique comme la sclérose en plaque (2). Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet bénéfique de ce peptide dans la DMLA.

Plus récemment, nous avons pu montrer que ce peptide, lorsqu'il est couplé à un agent d'imagerie nucléaire, est un excellent traceur des sites inflammatoires de par sa capacité à se fixer aux cellules exprimant CCR2. Cette découverte a permis d'initier un processus de maturation de ce peptide par la Satt-Lutech.

## — Production scientifique et valorisation

► Sennlaub F., Auvynet C., Calippe B., Hu S.H., Lavalette S., Dominguez E., Camelo S. Poupel L., Levy O., Guyon E., Saederup N., Charo I.F., Van Rooijen N., Nandrot E., Bourges J.-L., Behar-Cohen F., Sahel J.-A., Guillonnet X., Raoul W. and Combadère C. CCR2+ monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in a model of experimental subretinal inflammation. *EMBO Mol. Med* 2013 Nov;5(11):1775-93.

► Auvynet C, Baudesson de Chanville C, Hermand P, Dorgham K, Piesse C, Pouchy C, Carlier L, Poupel L, Barthélémy S, Felouzis V, Lacombe C, Sagan S, Salomon B, Deterre P, Sennlaub F and Combadère C. ECL1i, d(LGTFKLC), a novel, small peptide that specifically inhibits CCL2-dependent migration. *FASEB J.* 2016 Jun;30(6):2370-81.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet étaient basés sur un dépôt de brevet décrivant ECL1i comme produit anti-inflammatoire. La SATT-Lutech a décidé de se saisir de la valorisation du peptide et d'investir par une étape de prématurité (WO201300922A9). Un autre brevet décrivant ECL1i comme marqueur d'inflammation a été déposé en juillet 2015 et est intitulé "Novel CCR2 Imaging Agent for Inflammation". L'ensemble donne lieu à un projet de valorisation de la SATT-Lutech déposé en juin 2017.

**Le projet I-CKAIRE est un projet de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2013 et a duré 24 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 250 000 €.**

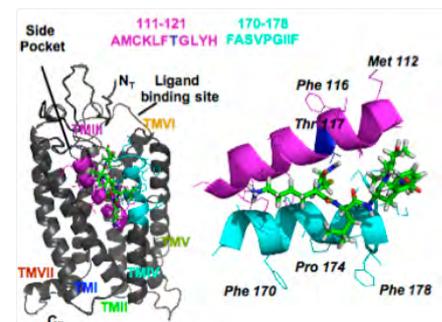
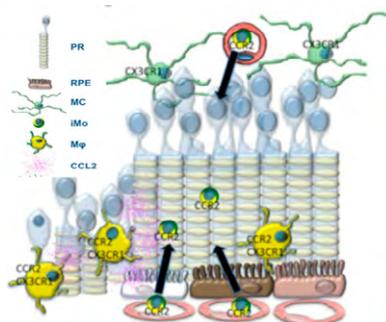
**Partenaires :** Institut de la Vision (Paris), DGRIT UPMC (Paris).

**COORDINATEUR**

**Christophe Combadère :** christophe.combadiere@upmc.fr  
Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses UMR-S945 (Paris)

Figure 1 (gauche) : Modèle d'infiltration monocytaire au cours de la DMLA. La chimiokine CCL2, libérée au niveau de la lésion rétinienne, recrute des monocytes inflammatoires (iMo) qui se différencient en macrophages (MP). Les photorécepteurs (PR) dégénèrent et la lésion s'agrandit. (RPE : retinal pigment epithelium ; MC : microglial cell).

Figure 2 (droite) : Visualisation en 3D de l'interaction du peptide antagoniste sur CCR2. Le peptide antagoniste est représenté en bâtonnet alors que CCR2 est en ruban (FASEB J. 2016).



# NeuroInflamDyn

## Étude par imagerie biphonique intravitale et cytométrie multiparamétrique de la dynamique de la neuroinflammation dans un modèle murin de sclérose en plaque

### — Rappel des objectifs

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie impliquant des attaques immunitaires du cerveau et de la moelle épinière. L'objectif de NeuroInflamDyn était d'analyser l'interdépendance de l'inflammation, de la neurodégénérescence et de la progression de la maladie. Pour cela nous avons combiné l'imagerie biphotonique in vivo, la cytométrie multiparamétrique et la génétique de la souris pour caractériser la dynamique de la neuroinflammation, aussi appelée réponse immunitaire innée, jusqu'ici peu étudiée. Nous avons démontré que la méthodologie développée est adéquate pour effectuer des tests de candidats médicaments, en analysant l'effet du blocage du facteur VEGF sur la réponse immunitaire et l'évolution de la maladie.

Pour cette étude, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), qui récapitule les caractéristiques de la SEP, est induite dans des souris Thy1-CFP // LysM-EGFP // CD11c-EYFP triple transgéniques dans lesquelles les axones dorso-spinaux, la microglie résidente et les monocytes circulants et leur progénie fluorescent dans différentes couleurs.

L'imagerie biphotonique intravitale récurrente non invasive de la moelle épinière du même animal, après installation d'une fenêtre dorsale vitrée, permet d'obtenir, des chronologies précises -de l'activation de la microglie (CD11c-EYFP) – du recrutement de cellules myéloïdes (LysM-EGFP) dans le parenchyme, de leur répartition spatiale, de leurs changements de morphologie, ainsi que de - la conséquence de leurs interactions avec les neurones (Thy1-CFP). En complément, la cytométrie multiparamétrique identifie de manière non équivoque la fréquence de sous-populations des cellules immunitaires impliquées lors des étapes critiques identifiées de la progression de la maladie. Une corrélation entre les événements cellulaires, la dégénération des axones et les scores cliniques peut donc être établie par l'imagerie lors de la progression de la maladie.

### — Résultats majeurs

Nous avons identifié les différentes étapes d'un programme immunitaire inné. Dans une première étape, des neutrophiles et des monocytes circulants envahissent la moelle épinière depuis les méninges. Le développement des « plaques » se produit selon un gradient à partir de la partie externe de la matière blanche de la moelle vers une zone plus profonde. En revanche, l'activation microgliale a lieu dans tout le parenchyme puis se concentre dans les plaques. La maturation des monocytes en cellules dendritiques (mo-DC) se produit au sein des plaques. L'apparition des mo-DCs doublement marquées (YEFP/EGFP) caractérise la stabilisation de la dégradation des axones et des signes cliniques et la prédominance de la microglie qui phagocyte les débris d'axones. Nous avons ensuite observé que le blocage du facteur VEGF par immunothérapie (injection de Bevacizumab) dès le début des signes cliniques, résulte en une amélioration de ces signes qui peut s'expliquer par une modification de la réponse immunitaire innée.

### — Production scientifique et valorisation

► Caravagna C, El Waly B, Rougon G, Debarbieux F. Single-Cell RNA Sequencing of parenchyma immune cells throughout mouse EAE reveals complex cell-state changes following VEGF blockade (*soumis*).

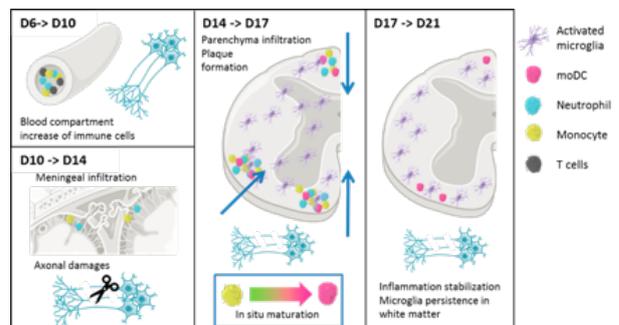


Schéma de la dynamique des événements de recrutements cellulaires au cours de la maladie. Crédit : © DR.

- Jaouen A, Caravagna C, Desplat-Jégo S, Fenrich K, Luche H, Rougon G, Malissen M & Debarbieux F. Dynamics and distribution of microglia and myeloid cells infiltrating the central nervous system during MOG-induced EAE *Scientific Reports*. 2018 23;8(1):5146. doi: 10.1038.
- Rougon G., Brasselet S., Debarbieux F. Advances in intravital optical imaging of the central nervous system in rodents. *Brain Plasticity* 2017 Dec 21;2(1):31-48. doi: 10.3233. Review.
- Chrobok NL, Jaouen A, Fenrich KK, Bol JG, Wilhelmus MM, Drukarch B, Debarbieux F, van Dam AM (2016) Monocyte behaviour and tissue transglutaminase expression during EAE in transgenic CX3CR1(gfp/gfp) mice. *Amino Acids*. 2016Nov9.
- Caravagna C., Jaouen A., Debarbieux F., Rougon G.(2016) Innovative mouse models for Imaging neuroinflammation *Current Protocols in Mouse Biology* 6(2):131-47. doi: 10.1002. Review
- Ricard C, Lamasse L, Jaouen A, Rougon G, Debarbieux F. Combination of an optical parametric oscillator and quantum-dots 655 to improve imaging depth of vasculature by intravital multicolor two-photon microscopy. *Biomed Opt Express*. 2016 May 24;7(6):2362-72. doi: 10.1364.

Les résultats ont donné lieu à des communications invitées dans des congrès (Bordeaux 2017, San Diego 2018) des conférences annuelles pour des associations de patients, la formation d'étudiants (Thèse Jaouen) et l'obtention de nouveaux contrats : bourse retour Marie-Curie (C. Caravagna), la mise au point d'une approche en imagerie permettant d'observer la dynamique de la myéline (ANR MyDeepCARS) et la participation au projet FET Neurofibre (ECC 2017-2022) (F. Debarbieux).

**Le projet NeuroInflamDYN est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2016 et a duré 57 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 435 000 €.**

**Partenaires :** Inserm UMS12, CIML, Université de la Méditerranée Aix-Marseille 2, AMU-INT Institut de Neurosciences de la Timone.

#### COORDINATEUR

**Franck Debarbieux :** [franck.debarbieux@univ-amu.fr](mailto:franck.debarbieux@univ-amu.fr)  
Université d'Aix-Marseille INT UMR7289  
<http://www.int.univ-amu.fr/spip.php?page=equipe>



# Maladies à Prions

PrPC&PDK1

p. 110

UNMASKINGBLOODPRIONS

p. 111

# PrPC&PDK1

## L'axe de signalisation PrP<sup>C</sup>-PDK1-TACE au carrefour des maladies neurodégénératives amyloïdes

### — Rappel des objectifs

#### PrPC&PDK1 : vers une cible thérapeutique commune à plusieurs maladies neurodégénératives amyloïdes ?

En 2013, nous avons identifié une cascade de signalisation pathologique commune aux maladies à prions et d'Alzheimer. Les prions pathogènes (PrP<sup>Sc</sup>) ou les peptides Ab de l'Alzheimer suractivent une kinase, PDK1, qui vient neutraliser une enzyme protectrice, l' $\alpha$ -sécrétase TACE. TACE ne peut plus cliver (i) la protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup> non pathologique, favorisant sa conversion en PrP<sup>Sc</sup> dans les maladies à prions, (ii) la protéine précurseur des peptides amyloïdes APP, amplifiant la production des peptides Ab dans la MH, et (iii) les récepteurs au TNF $\alpha$ , qui s'accumulent à la surface des neurones malades les rendant hypervulnérables au stress inflammatoire. Inhiber PDK1 contre la toxicité de PrP<sup>Sc</sup> et Ab, réduit les déficits moteurs et prolonge la survie des souris infectées par les prions, et corrige les défauts cognitifs et de mémoire des souris « Alzheimer ». Confortés par la mesure d'une augmentation d'activité PDK1 dans le cerveau post-mortem des patients Alzheimer, nos travaux posent PDK1 comme une cible thérapeutique face aux maladies à prions et d'Alzheimer.

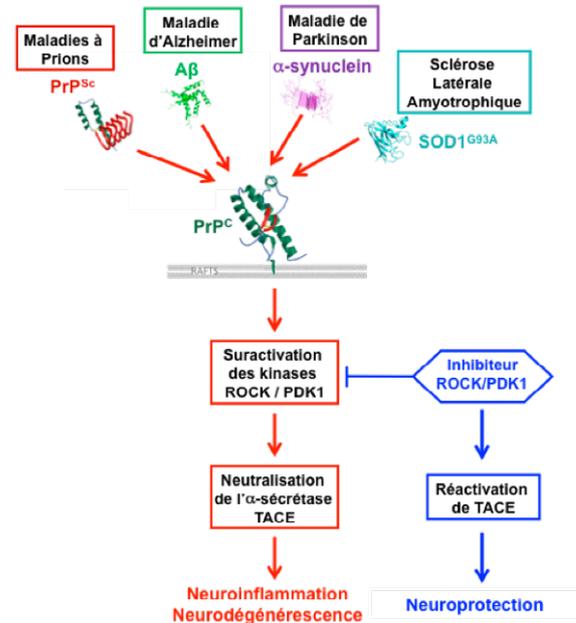
L'objectif du projet PrPC&PDK1 est de cerner si la dérégulation de l'axe de signalisation PDK1-TACE constitue un trait de neurodégénérescence partagé par d'autres maladies neurodégénératives amyloïdes.

### — Résultats majeurs

Le projet PrPC&PDK1 montre que la dérégulation de l'axe PDK1-TACE dans les maladies à prions ou d'Alzheimer dépend de l'interaction de PrP<sup>Sc</sup> ou d'Ab avec la PrP<sup>C</sup> à la surface des neurones et d'une déviation de la fonction de signalisation protectrice de la PrP<sup>C</sup>. Nos travaux identifient la kinase ROCK comme un régulateur positif de PDK1 qui contribue à la suractivation de PDK1 dans un contexte neurodégénératif.

Le projet PrPC&PDK1 révèle que la déviation de l'axe PDK1-TACE par PrP<sup>Sc</sup> provoque aussi l'accumulation des peptides Ab dans les maladies à prions. Les peptides Ab n'impactent ni la réplication ni l'infectiosité de PrP<sup>Sc</sup>. Ils peuvent toutefois former des plaques amyloïdes dans le cerveau des souris infectées par les prions si et seulement si un « noyau » constitué de trimères d'Ab est co-transmis avec la PrP<sup>Sc</sup>. Le dépôt d'Ab corrèle avec une mort accélérée de ces souris.

La PrP<sup>C</sup> émerge aujourd'hui comme un senseur membranaire capable de reconnaître différentes protéines amyloïdes. Les travaux en cours visent à montrer que l' $\alpha$ -synucléine pathologique (maladie de Parkinson) ou des formes mutantes de la superoxyde dismutase 1 (SLA) interagissent avec la PrP<sup>C</sup> et modifient sa fonction de signalisation menant à l'activation de la pathocascade PDK1-TACE. Cette partie du projet pourrait permettre de définir PDK1 comme une cible thérapeutique à spectre large pour lutter contre plusieurs maladies neurodégénératives non-apparentées sur le plan clinique, mais convergentes sur le plan mécanistique.



Projet PrPC&PDK1: L'axe de signalisation PrP<sup>C</sup>-PDK1-TACE au carrefour des maladies neurodégénératives amyloïdes.

Crédit : © Mathéa Pietri (MCU Université de Paris) et Benoit Schneider (DR CNRS).

### — Production scientifique et valorisation

- ▶ Ezpeleta J *et al.*, (2019) Nat Commun. 10(1):3442.
- ▶ Ezpeleta J *et al.*, (2017) Sci Rep. 7(1):7671.
- ▶ Alleaume-Butaux A *et al.*, (2015) PLoS Pathog. 11(8):e1005073.

Les résultats ont donné lieu à des communications dans des congrès sur les maladies neurodégénératives amyloïdes (Alzheimer/Parkinson 2015, France; 2nd Zing Conference 2015, Mexique; Neuropathologie 2016, France; Prion2017, Ecosse; CoEN 2017, France; Prion2019, Canada; 8th and 9th Iberian Congress on Prion diseases, 2018 Espagne, 2019 Portugal).

**Le projet PrPC&PDK1 est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a démarré en décembre 2014 et a duré 60 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR à hauteur de 355 640 €.**

**Partenaires :** McGill University (Canada), VIB Center for the Biology of Disease (Belgique), DZNE Tübingen (Allemagne), University of Sherbrooke (Canada), University of Oslo (Norvège).

#### COORDINATEUR

**Benoit Schneider :** benoit.schneider@parisdescartes.fr  
University Paris Descartes - Inserm UMR-S 1124  
<https://t3s-1124.biomedicale.parisdescartes.fr/nos-equipes-de-recherche/equipe-5/>

## UNMASKINGBLOODPRIONS

## Développement de nouveaux outils pour l'identification de prions cryptiques dans le sang

## — Rappel des objectifs

En dépit d'une large exposition de la population du Royaume Uni, et dans une moindre mesure de la population française, à l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB, maladie dite de la « vache folle », pour laquelle plus de 2 millions de bovins infectés non diagnostiqués seraient entrés dans la chaîne alimentaire humaine) le nombre de cas de transmission à l'homme (v-MCJ - variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob) n'a connu qu'un pic limité dans les années 2000 et un nombre total de 206 cas humains observés dans ces 2 pays les plus touchés au monde. Cependant avec des périodes d'incubation silencieuses de plusieurs dizaines d'années chez l'homme, de nombreuses interrogations subsistent notamment pour les risques de transmission secondaires au travers des actes médico-chirurgicaux dont la transfusion sanguine. Ainsi, à titre de précaution, les citoyens britanniques et français sont exclus du don du sang aux Etats-Unis et au Canada.

Dans ce contexte la réévaluation récente du nombre de porteurs asymptomatiques, par ailleurs donateurs de sang potentiels, au Royaume-Uni à près de 1/2000 (sur la base de la positivité de pièces d'appendicectomie pour la protéine du prion, ou PrP, anormale), soit près de 200 fois plus que le nombre de cas cliniques observés, remet en cause la maîtrise apparente de l'impact de l'ESB sur la santé humaine. Cette situation épidémiologique, possiblement liée à une exposition hétérogène des consommateurs, pose les questions de l'évolution clinique potentielle de ces porteurs asymptomatiques (risque primaire d'exposition orale à de faibles doses) et du risque infectieux qu'ils représentent en termes de transmissions secondaires.

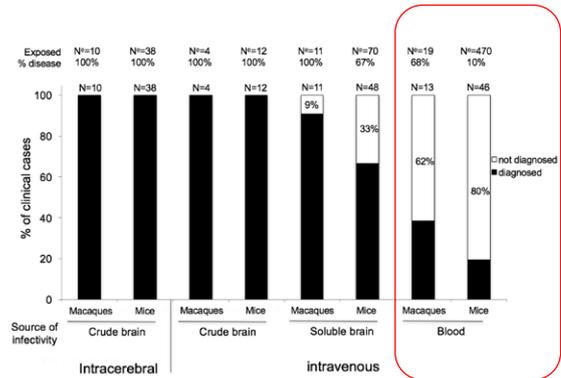
## — Résultats majeurs

Dans le cadre d'un projet précédent dédié à ces questions et financé par l'ANR (projet LowPrion), nous avons observé chez des primates exposés expérimentalement à ces mêmes agents l'apparition, après de très longues périodes d'incubation, de maladies neurologiques fatales transmissibles par transfusion sanguine qui ne seraient pas identifiées comme maladies à prions sur la base des critères actuels de diagnostic (notamment absence apparente de l'accumulation de PrP anormale). Ces formes atypiques correspondent à une atteinte ciblée de la moelle épinière.

Dans le cadre du présent projet, de nouvelles techniques de démasquage d'épitope nous ont permis d'augmenter la sensibilité de détection des maladies à prions classiques et également de mettre en évidence de nouvelles formes de PrP anormale, jamais observées avec les techniques classiques les plus sensibles, dans les organes périphériques des individus exposés à l'agent de l'ESB y compris ceux développant ces maladies atypiques. La distribution tissulaire et cellulaire de ces nouvelles formes suggère une physiopathologie périphérique différente de celle classiquement décrite.

L'analyse extensive des organes périphériques d'une trentaine de macaques infectés a souligné une hétérogénéité importante, intra- et inter-individuelle, de la distribution des prions détectables par les différentes techniques utilisées. Le risque de transmission secondaire de la « forme classique » de vMCJ par transfusion serait proportionnel à l'accumulation périphérique de PrP anormale classiquement détectée, et principalement concentré sur la période clinique du donneur. En revanche, le risque de transmission des formes atypiques semble en être décorrélé, soit un risque aujourd'hui non quantifié de transmission

Une majorité des animaux transfusés développent une maladie fatale non diagnostiquée comme liée aux prions sur la base des tests classiques



Crédit : © DR.

secondaire à partir de donateurs pendant tout ou partie de la période d'incubation silencieuse de la maladie et plus généralement à partir de porteurs asymptomatiques.

Nous pensons ainsi que le champ des maladies à prions chez l'homme dépasse très largement celui délimité par les techniques classiques de détection de la PrP anormale et qu'il est impératif d'explorer de nouvelles pistes technologiques susceptibles d'aboutir à une évaluation rationnelle du risque lié aux porteurs asymptomatiques et à des tests utilisables à grande échelle s'il s'avère nécessaire de prévenir le risque de contamination secondaire notamment par transfusion.

## — Production scientifique et valorisation

Ces travaux ont fait l'objet de 3 publications scientifiques et de 7 communications au cours de congrès scientifiques internationaux. Sur la base de ces observations, la Direction Générale de la Santé a mis en place une surveillance neurologique des patients atteints de trouble de la coagulation en tant que population à risque.

- Comoy E, Mikol J, Jaffré N et al. (2017) Experimental transfusion of variant CJD-infected blood reveals novel class of prion disorder in mice and macaque. *Nat. Comm.* 8:1268. Doi:10.1038/s41467-017-01347-01
- Levavasseur E, Biacabe AG, Comoy E et al. (2017) Detection and partial discrimination of atypical and classical bovine spongiform encephalopathies in cattle and primates using real-time quaking-induced conversion assay. *PLoS One.* 12(2):e0172428.
- Huor A, Douet JY, Lacroux C et al (2017) Infectivity in bone marrow from sporadic CJD patients. *J Pathol.* 243 : 273-278.

Le projet UNMASKINGBLOODPRIONS est un projet collaboratif de recherche fondamentale. Le projet a commencé en janvier 2016 et a duré 45 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 655 720 €.

Partenaires : INSERM La Pitié-Salpêtrière (Paris), Les Hospices civils de Lyon, EFS-TransDiag (Montpellier), UMR 1225 IHAP INRA-Ecole Vétérinaire (Toulouse).

## COORDINATEUR

Emmanuel Comoy : emmanuel.comoy@cea.fr  
CEA Service d'Etude des Prions et de Infections Atypiques (Fontenay-aux-Roses)



# Innovations technologiques

MicroDeg

p. 113

Neuroscreen

p. 114

# MicroDeg

## Neuronal Networks in microfluidic chips for the study of propagative neuronal disorders

### — Rappel des objectifs

Les syndromes neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, les démences à corps de Lewis, ou la sclérose amyotrophique latérale, partagent le point commun de provoquer l'agrégation progressive de protéines neuronales spécifiques de chaque pathologie et d'enclencher des phénomènes de dégénérescence axonale et synaptique précoce qui aboutissent à la déstructuration des réseaux de neurones. Les données récentes de la littérature indiquent que les stigmates neuropathologiques sont initiés dans des zones précises du cerveau et progressent le long des voies nerveuses dans le cerveau des patients atteints, chaque pathologie semblant suivre un patron de dissémination non aléatoire et spécifique. Ceci suggère que certaines structures cérébrales puissent agir comme des « épices » dégénératifs irradiant la pathologie vers des zones distantes selon des mécanismes cellulaires et moléculaires qui restent à décrypter. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer ce type de phénomène, la dissémination des agrégats de protéines selon un mode « prion like » quasi infectieux semblait séduisante. Dans ce scénario s'apparentant aux maladies à prions, une graine d'agrégat protéique se dissémine d'un neurone à l'autre et provoque son auto-amplification en recrutant un conformère de la même protéine produite par le neurone. Au lancement du projet MicroDeg, quelques observations réalisées sur des modèles animaux vulnérabilisés semblaient étayer cette hypothèse. Cependant tant les modalités cellulaires et moléculaires de la propagation « Prion Like » le long des réseaux de neurones que la validité de ce scénario chez l'humain demeurait inconnue.

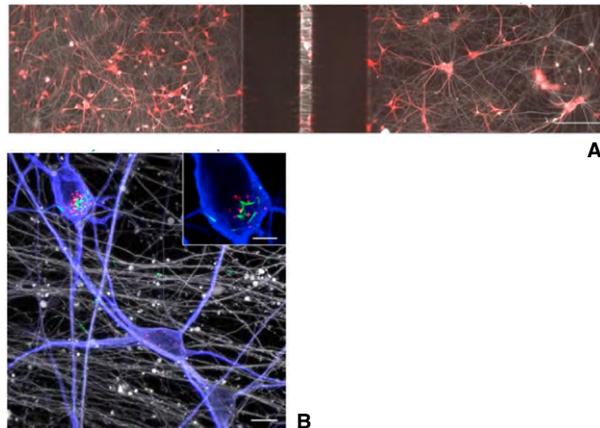
Dans ce contexte, l'objectif du projet MicroDeg était donc de développer de nouveaux modèles expérimentaux permettant d'aborder spécifiquement ces questions. Ainsi, le premier objectif du projet MicroDeg était de développer des approches technologiques de type « brain on chip » et permettant de reconstruire des réseaux de neurones sur puce, d'en caractériser les propriétés neurophysiologiques et d'entreprendre à l'aide des technologies de différenciation des cellules souches pluripotentes induites la reconstruction de modèles de voies neuroanatomiques humaines. Le second objectif de MicroDeg était de valider l'hypothèse Prion like au niveau humain et des modalités de la propagation des agrégats de Synucléine, une protéine impliquée dans la maladie de Parkinson, dans ces micro-modèles de réseaux de neurones.

### — Résultats majeurs

Les principaux résultats obtenus sont de 3 ordres.

**1) Création de nouvelles plateformes de cultures microfluidiques permettant la reconstruction de réseaux de neurones complètement orientés.** Les systèmes de cultures microfluidiques permettent de manipuler les cellules dans des micro-environnements contrôlés. La reconstruction de réseaux de neurones dans ce type d'environnement requiert de contrôler la direction de la croissance des axones pour qu'un neurone en connecte un suivant sans que l'inverse ne soit vrai. En développant des techniques de micro-patterning et de microfabrication originale le projet MicroDeg a permis de mettre au point des micro-dispositifs qui permettent la connexion 100% orientée des neurones entre eux.

**2) Reconstruction de voies neuroanatomiques humaines sur puce.** À l'aide de ces dispositifs, des réseaux de neurones de rongeurs mais aussi dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines ont été reconstruits et leur propriété



**A) Réseaux de neurones humains reconstruit dans un dispositif de culture microfluidique.** Deux populations neuronales sont ensemencées dans des chambres de cultures interconnectées par des microstructures (zones noires) ne laissant passer les axones que dans une direction unique. **B) Propagation « prion-like » de la synucléine dans des réseaux de neurones humains.** Neurones corticaux humains exposés indirectement à des agrégats recombinants de synucléine (rouge) et présentant des signes de nucléation de la synucléine neuronale (vert). Crédit : © Simona Griboudo, Stem cell Rep.

neurophysiologique caractérisés. Les réseaux de neurones ainsi fabriqués présentent une connectivité structurale et fonctionnelle permettant d'étudier et de manipuler le dialogue entre des neurones de sous-types différents.

**3) Démonstration du caractère Prion Like de la synucléine dans les réseaux de neurones humains.** Les modèles de réseaux de neurones humains ont été empoisonnés localement par des agrégats de synucléine. Ceci a permis de montrer que les graines de synucléine se dispersent rapidement d'un neurone vers l'autre et provoquent une nucléation sur un mode prion dans les neurones humains, en provoquant par ailleurs des altérations mitochondriales et des rythmes neuronaux.

### — Production scientifique et valorisation

Les résultats obtenus par les membres du consortium international ont donné lieu à 30 publications scientifiques dans des journaux à comité de lecture et une vingtaine de communications sous forme de présentation orale ou poster. Un brevet portant sur la conception de nouveaux microsystèmes permettant la reconstruction de réseaux de neurones orientés a par ailleurs été déposé.

**Le projet MicroDeg** est un projet collaboratif international de recherche fondamentale. Le projet a commencé en novembre 2013 et a duré 48 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 654 966 €.

**Partenaires :** Laboratoire maladie Neurodégénératives, ISTEM (Evry), Laboratoire Macromolécules et microsystèmes en Biologie, Institut Curie (Paris), CIC bioGUNE (Espagne), Institute of Complex Systems, FZ Jülich (Allemagne).

#### COORDINATEUR

**Jean-Michel Peyrin :** jean-michel.peyrin@upmc.fr  
Laboratoire Neurosciences Paris Seine UMR8246, Sorbonne Université Paris

# Neuroscreen

## Microfluidic platform for cell culture, *in vitro* construction of complex neuronal networks and the screening of neuroprotective molecules

### — Rappel des objectifs

#### Des puces microfluidiques à l'assaut des maladies neuro-dégénératives.

Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer et les autres maladies neurodégénératives deviennent des enjeux majeurs de santé publique. La recherche pharmaceutique et clinique dans ce domaine progresse à un rythme relativement lent, et ce rythme est notamment lié aux limites des modèles expérimentaux actuels.

Des systèmes de cultures neuronales utilisés en routine dans les laboratoires académiques et les industries pharmaceutiques ne permettent que l'étude (ou le criblage) des mécanismes à l'échelle du neurone unique et ne respectent absolument pas la connectique cérébrale et l'organisation en voies neuro-anatomiques orientées, qui sous-tendent le fonctionnement normal du cerveau. L'objectif de ce projet était de recréer à l'aide de méthodologies alliant micro-technologies et culture cellulaire, des modèles intégrés de réseaux de neurones orientés permettant d'étudier les phénomènes neurodégénératifs et le potentiel de molécules pharmaceutiques. Ce projet nous a permis de faire fructifier nos résultats de recherche fondamentale et de proposer une plateforme microfluidique conviviale (ou facile à utiliser) qui permet l'évaluation de molécules à visées thérapeutiques dans un contexte physiopathologique intégré et complexe.

#### Plateforme microfluidique de neurones en réseaux permettant l'évaluation de molécules à visées thérapeutiques.

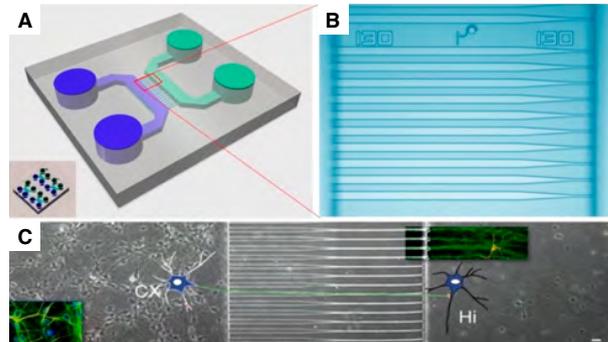
En combinant des preuves de concepts que nous avons déjà acquises dans le domaine de la microfluidique et des neurosciences, nous disposons actuellement d'une plateforme expérimentale permettant l'étude sérialisée, à l'échelle des réseaux de neurones, des événements précoces observés au cours de la maladie d'Alzheimer mais également d'autres maladies neuro-dégénératives. Au cours de ce projet nous avons optimisé les puces microfluidiques au niveau de leur layout (capacité de filtration et guidage axonales) et de leur fabrication (reproductibilité, fiabilité). En conséquence nous avons pu augmenter la capacité de production des puces microfluidiques permettant de mener à bien des études précliniques. En parallèle nous avons développé différents « read-outs », qui nous permettent de suivre l'effet d'un stress neuronal mais également d'un agent synapto- et axo-protecteur en temps réel et sur des neurones fixés.

### — Résultats majeurs

L'optimisation de cette plateforme microfluidique nous a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour contrer la dégénérescence axonale et synaptique dans des modèles de syndromes neurodégénératifs chroniques tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, mais également dans des modèles d'ischémies associées à des syndromes neurologiques aigus. La validation de cette plateforme comme outil de criblage de molécule à visée thérapeutique a permis la création de la startup MicroBrain Biotech qui a pris en charge la transition d'un outil de laboratoire vers des produits industriels.

### — Production scientifique et valorisation

► Deleglise B, Lassus B, Soubeyre V, Doulazmi M, Brugg B, Vanhoutte P, Peyrin JM. Dysregulated Neurotransmission induces Trans-synaptic degeneration in reconstructed Neuronal Networks. *Sci Rep*. 2018 Aug 2;8(1):11596.



Les diodes microfluidiques et leur application pour modéliser des maladies neurodégénératives. A) Puce microfluidique comportant quatre dispositifs. Chaque dispositif possède deux chambres de culture reliées par une série de micro-canaux. B) Les micro-canaux en forme d'entonnoir entre les deux chambres ne sont pas visibles à l'œil nu et laissent passer les axones uniquement dans un sens. C) Culture d'un réseau cortico (CX) - Hippocampique (Hi) vert : axones, bleu : somas. Les axones corticaux (vert) sortent des micro-canaux et projettent sur les dendrites (en bleu) des neurones hippocampiques et forment des connexions synaptiques. Crédit : © DR.

- Vaur P, Brugg B, Mericskay M, Li Z, Schmidt MS, Vivien D, Orset C, Jacotot E, Brenner C, Duplus E. Nicotinamide riboside, a form of vitamin B3, protects against excitotoxicity-induced axonal degeneration. *FASEB J*. 2017 Dec;31(12):5440-5452.
- Deleglise B, Magnifico S, Duplus E, Vaur P, Soubeyre V, Belle M, Vignes M, Viovy JL, Jacotot E, Peyrin JM, Brugg B.  $\beta$ -amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol. Commun*. 2014 Sep 25;2:145.
- Deleglise B, Lassus B, Soubeyre V, Alleaume-Butaux A, Hjorth JJ, Vignes M, Schneider B, Brugg B, Viovy JL, Peyrin JM. Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PLoS One*. 2013 Aug 16;8(8):e71103.

Cette plateforme microfluidique, modélisant un certain nombre de conditions pathologiques associées à des syndromes neurodégénératifs chroniques, a donné lieu à dix publications dans des revues internationales et trois brevets. Le projet a en outre permis la création de l'entreprise Microbrain Biotech incubée au sein de l'IPGG, à Agoranove et à la Station F. L'institut Curie, le CNRS et l'UPMC ont concédé (2015) un contrat de licence exclusive à la société MicroBrainBiotech pour le brevet PCT/FR2009/001198 (WO2010040920A2) intitulé "DEVICE FOR CELL CULTURE".

**Le projet Neuroscreen est un projet collaboratif public-privé se situant à la frontière entre la recherche fondamentale et industrielle (RPIB). Le projet a commencé en février 2012 et a duré 54 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 815 000 €.**

**Partenaires :** UMR 168 Institut Curie, société Fluigent.

#### COORDINATEUR

**Bernard Brugg** : [bernard.brugg@upmc.fr](mailto:bernard.brugg@upmc.fr)  
CNRS UMR 8256 - Adaptation Biologique et Vieillescence  
[www.microbrainbiotech.com](http://www.microbrainbiotech.com)

Les données et analyses présentées dans ce cahier sont issues du Bilan interne ANR sur les Maladies Neurodégénératives 2010-2018, réalisé en 2019 par Morgane Bourdonnais, Kiri Couchman, Hayet Pigeon, Geneviève Rougon, Catherine Heurteaux et Sheyla Mejia-Gervacio.

**Conception et coordination éditoriale :**

Catherine Heurteaux, Morgane Bourdonnais, Sheyla Mejia Gervacio, Hayet Pigeon et Kiri Couchman en collaboration avec la Direction de l'Information et de la Communication

**Conception et réalisation graphique :**

[www.ba-ba.fr](http://www.ba-ba.fr)

**Crédits photos :**

Adobe Stock

« Gratuit ne peut être vendu »

# anr<sup>©</sup>

Nous suivre sur :  @agencerecherche  ANR  ANR

[www.anr.fr](http://www.anr.fr) - [www.anr.fr/en](http://www.anr.fr/en)