

Titre du projet

Séquence développementale du GABA dans le syndrome de Rett

Etablissement présentant le projet :

SIGLE :	Neurochlore
Nom Complet :	Neurochlore
Adresse :	Bâtiment Inmed - Inserm U901 Parc scientifique de Luminy 163 route de Luminy 13273 Marseille Cedex 09
Directeur :	Yehezkel BEN-ARI
Directeur du projet :	Yehezkel BEN-ARI
Effectif en PACA	16 personnes (au 31/12/2016, hors consultants)
Courriel :	ben-ari@neurochlore.fr
Téléphone :	04 84 26 90 60

Responsable de l'équipe/service/unité

Yehezkel Ben-Ari

Responsable du post-doctorant

Yehezkel Ben-Ari

Présentation du projet de recherche

Titre du projet	Séquence développementale du GABA dans le syndrome de Rett		
Domaine principal	Sciences de la vie et de la santé	Domaine secondaire	Electrophysiologie (anatomie et morphologie)

Description résumée du projet (250 mots)

(Joindre une présentation détaillée du projet (2 pages) en annexe n°1). Faire ressortir le lien avec les neurosciences

Nous avons récemment montré un lien entre autisme, concentration intracellulaire en ions chlorure ($[Cl^-]_i$) et action du GABA. Nous avons découvert que la naissance est associée à une baisse dramatique des taux de $[Cl^-]_i$ médiée par l'ocytocine exerçant ainsi une forte action neuroprotectrice sur le cerveau du nouveau-né (Tyzio *et al.*, 2006). Cette séquence est abolie dans l'autisme et le syndrome de l'X-Fragile, le GABA a donc une action dépolarisante sur les neurones. L'administration à la mère d'un diurétique réduit les taux de $[Cl^-]_i$, restaure à la naissance une action hyperpolarisante du GABA et atténue en conséquence chez l'adulte les signatures électriques et comportementales de l'autisme (Tyzio *et al.*, 2014, Eftekhari *et al.*, 2014). Un essai clinique chez des enfants a confirmé le potentiel thérapeutique de la Bumétanide sur le syndrome autistique (Lemonnier *et al.*, 2012).

Nous voulons ici poursuivre et développer notre travail sur le rôle du GABA dans l'autisme et particulièrement sur le Syndrome de Rett (SR). Le SR se manifeste de manière retardée après une période de développement normal (Chao and Zoghbi, 2012), les traits typiques apparaissant 6 à 18 mois après la naissance. Notre but est d'identifier des signatures précoces de la maladie comme réalisé précédemment pour le syndrome autistique.

Notre hypothèse est que la régulation de $[Cl^-]_i$ est déficiente, le GABA excitant les neurones pendant la naissance, aggravant ainsi les activités cérébrales. Ces données serviraient de base aux essais cliniques européens que nous espérons mener.

Conséquences attendues sur les plans scientifique, commercial et/ou clinique:

Nous escomptons des résultats positifs dans le modèle murin du syndrome de Rett et, en particulier, une abolition du changement du chlore intracellulaire ainsi que la correction des aspects autistiques par la Bumétanide. La réalisation de ce programme conduira alors à des publications dans des journaux et des revues de renom à fort impact. Cependant, comme nous sommes également impliqués dans des essais cliniques, nos investigations vont rapidement mener, si les résultats sont positifs, à des études pilotes visant à déterminer si la Bumétanide réduit la sévérité des symptômes dans le SR. Ce lien rapide et fort entre données cliniques et expérimentales est unique plus particulièrement car la Bumétanide est utilisée depuis plusieurs décennies et est plutôt dépourvue d'effets secondaires (exception faite d'une diurèse). Nous allons, par ailleurs, mettre en place un essai clinique européen (5 pays) visant à évaluer l'efficacité de la Bumétanide sur le SR.

Quelles sont les raisons qui incitent la société ou le service clinique à engager ce projet ?

(contexte concurrentiel, amélioration/évolution de produits, demande du marché)

Il existe actuellement un contexte concurrentiel important : il est donc crucial d'accumuler des données rapidement et de façon contraignante concernant les actions du médicament que nous développons sur l'excitabilité neuronale. Par ailleurs, l'étude des altérations qui interviennent lors de la naissance en relation avec l'émergence de la maladie constitue un problème de santé publique majeure.

En quoi le projet est-il innovant ?

(saut technologique, acquisition de nouvelles compétences, mise en place de partenariats technologiques)

Les troubles neurologiques développementaux tels que les TSA (Troubles du Spectre Autistique) et le syndrome de Rett constituent des problèmes thérapeutiques majeurs non résolus. En effet, ces troubles précoces affectent la qualité de vie au niveau de l'autonomie, l'éducation, l'emploi, la mobilité, les relations personnelles, les assurances et les droits. Nos travaux sont les premiers qui incluent des enregistrements de neurones et une analyse morphologique/anatomique pendant le développement dans un modèle murin du syndrome de Rett. De plus, l'innovation est évidente sachant que notre but est de développer un médicament pour une maladie majeure qui n'a pas de traitement efficace à l'heure actuelle.

Quelles sont les retombées attendues ? Quelles sont les perspectives d'emploi à l'issue du contrat post-doctoral ?

Ces travaux permettraient de confirmer l'importance centrale d'une dérégulation de l'homéostasie chlorure dans les troubles autistiques, incluant le syndrome de Rett. Fort de ces résultats, le traitement par la Bumétanide apparaîtrait comme un espoir thérapeutique dans cette pathologie pour laquelle il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement. Si les données obtenues s'avèrent positives, les perspectives d'emploi seront grandes aussi bien dans notre entreprise que dans d'autres sachant que ces données seront publiées dans les meilleures revues internationales et seront donc essentielles dans le CV futur du candidat.

Liste des contrats obtenus au cours des 5 dernières années.

2011 : Avance remboursable - Incubateur Impulse (34 000 euros)
2011 : Subvention ADI - Bpifrance (30 000 euros)
2012 : Avance remboursable - Bpifrance (340 000 euros)
2013 : Subvention projet « Cure Autism » - ANR (625 560 euros)
2014 : Subvention APT - Bpifrance (15 000 euros)
2014 : Avance remboursable - Bpifrance (500 000 euros)
2014 : Subvention projet « Dev Autism » - ANR (260 820 euros)
2014 : Fondation Bettencourt Schueller (400 000 euros)

Intérêt du projet pour la société et le candidat

Pour le candidat : à l'évidence, la réalisation de ce programme conduira à des publications dans des journaux et des revues de renom à fort impact qui le placeront dans une excellente position pour un recrutement, cela ajouté aux compétences qu'il aura acquises.

Pour la société : la société étant impliquée dans des essais cliniques, nos investigations vont rapidement mener, si les résultats sont positifs, à des études pilotes visant à déterminer si la Bumétanide réduit la sévérité du syndrome de Rett. La Bumétanide étant utilisée depuis plusieurs décennies et étant plutôt connue comme dépourvue d'effets secondaires (exception faite d'une diurèse), il sera donc relativement simple et rapide d'obtenir une autorisation pour mener des études pilotes.

Signatures et cachets

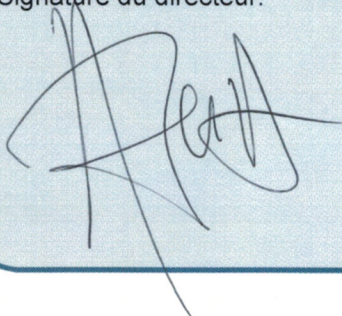
Engagement de la société ou du service

Je soussigné

- * demande au programme doctoral ICN d'examiner le présent dossier de candidature en vue de l'obtention d'une bourse post-doctorale pour le projet
- * déclare avoir pris connaissance des modalités d'attribution et de financement de la dite bourse
- * m'engage à fournir les conditions indispensables au bon déroulement du contrat
- * m'engage à informer au plus tôt le programme doctoral ICN de toute modification apportée au projet

Fait à Marseille, le 12/01/2017

Signature du directeur:



Cachet de la société ou du service :

NEUROCHLORE
INMED Parc Scientifique de Luminy
13273 Marseille Cedex 09
Tél. 04 91 82 81 76
533 864 070 RCS Marseille

Annexe 1 : Projet détaillé

Séquence développementale du GABA dans le Syndrome de Rett

Nous avons fait 3 découvertes fondamentales qui sont à l'origine de ce programme :

i) Pendant la naissance, il se produit une baisse majeure du chlore intracellulaire ([Cl⁻]_i) et un shift du GABA excitateur vers un GABA inhibiteur. Ce shift est produit par l'ocytocine qui déclenche aussi l'accouchement et a une action neuro-protectrice sur les neurones (Tyzio et al., Science, 2006).

ii) Ce shift est abolit dans un modèle génétique de Troubles du Spectre Autistique (TSA) - la souris modèle du syndrome de l'X-Fragile - et dans le modèle Valproate *in utero*. L'administration d'un diurétique - la Bumétanide - à la mère restaure le shift pendant la naissance ainsi que les oscillations cérébrales physiologiques et atténue le comportement autistique chez les descendants. Ces résultats suggèrent un rôle central de la polarité du GABA sur la pathogenèse des TSA (Tyzio et al., Science, 2014 ; Eftekhari et al., Science, 2014).

iii) Le traitement d'enfants atteints de TSA avec la Bumétanide atténue la sévérité du syndrome autistique (Lemonnier et al., 2012) comme nous avons pu le montrer dans un essai clinique mené en double aveugle et portant sur 54 enfants âgés de 3 à 11 ans.

Suite à cette dernière étude, un essai clinique randomisé en double aveugle approuvé par l'EMA (European Medicines Agency) a été mené dans 6 centres français. Il a concerné 88 enfants et adolescents âgés de 2 à 18 ans ; les résultats viennent d'être acceptés pour publication. La licence du brevet mondial déposé a été cédée à Neurochlore qui poursuit donc actuellement ces travaux. La Bumétanide est à l'heure actuelle le seul médicament potentiel qui traite l'aspect communication, symptôme au cœur des TSA. En effet, les deux autres molécules sur le marché (Rispéridone et Aripiprazole) ne traitent pas cet aspect et ont des effets secondaires majeurs.

Nous voulons ici poursuivre et développer notre travail sur le rôle du GABA dans les TSA et particulièrement sur le Syndrome de Rett (SR). Le SR est une pathologie d'origine génétique liée au chromosome X. Pour cette raison, les garçons touchés par cette pathologie ne sont généralement pas viables (Esteller, 2007). Chez les filles, le SR est une des causes les plus fréquentes de retards mentaux et de troubles autistiques, puisqu'il affecte environ une naissance pour 10 000 (Duarte et al., 2013). Le SR est provoqué par des mutations du gène MECP2, provoquant une perte de fonction de la Methyl-CpG Binding Protein 2 (MeCP2 ; Percy et al., 2004). Exprimée dans de nombreux tissus, cette protéine se lie à l'ADN méthylé pour réguler l'expression d'une grande variété de gènes (Esteller, 2007). L'expression de la protéine MeCP2 est régulée au cours du développement : forte pendant le développement embryonnaire, puis faible à la naissance au moment de la maturation neuronale et la synaptogenèse ; cette protéine est ensuite présente en abondance dans les neurones post-mitotiques du cerveau adulte (Banerjee et al., 2012). Au niveau clinique, le Syndrome de Rett se manifeste de manière retardée, suite à une période de développement normal (Chao and Zoghbi, 2012). Les traits typiques du Syndrome apparaissent ainsi 6 à 18 mois après la naissance. Les signes cliniques comprennent une régression des capacités d'apprentissage et motrices, un retard mental, le développement de mouvements stéréotypés, des traits autistiques, une spasticité, des anomalies respiratoires, des troubles du système nerveux autonome, et une épilepsie dans de nombreux cas (Duarte et al., 2013).

Hypothèse

Notre hypothèse de travail est qu'une déficience de la régulation du chlore est une caractéristique générale des TSA et des troubles associés comme le Syndrome de Rett, qui provoquerait un défaut de maturation du système GABAergique.

Renforçant cette hypothèse, (i) le modèle murin du Syndrome de Rett mutant pour MeCP2 est également déficitaire pour la production de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor ; Duarte et al., 2013), facteur de croissance capital, le BDNF régule l'expression des transporteurs de chlore ; et (ii), le dosage de KCC2 chez des filles âgées de 1 à 19 jours a révélé une diminution de l'exportateur dans le liquide céphalo-rachidien des filles atteintes du Syndrome de Rett en comparaison à une population contrôle. Cette baisse s'accompagne d'une dérégulation du ratio NKCC1 : KCC2 (Duarte et al., 2013).

Objectif

Notre objectif global est d'évaluer le rôle du GABA dans le syndrome de Rett, et de déterminer :

- 1) si une déficience dans la régulation du [Cl⁻]_i est une caractéristique générale des TSA indépendamment de son origine génétique (mutation) et si la séquence développementale du GABA est altérée dans le modèle murin MeCP2,
- 2) si dans le modèle murin MeCP2 du syndrome de Rett il y a des altérations morphologiques dans le cerveau pendant le développement, et
- 3) si la Bumétanide, diurétique réduisant les taux intracellulaires de chlore, corrigerait les signatures électriques, morphologiques et comportementales du syndrome.

Approche expérimentale

Nous utiliserons le modèle souris du syndrome de Rett qui a une délétion pour MeCP2. Nous emploierons un large éventail de techniques physiologiques et biochimiques qui ont déjà été utilisées dans la précédente publication de notre équipe (Tyzio et al., Science, 2014), et qui comprend : des enregistrements de canaux unitaires NMDA et GABA sur des neurones pyramidaux au niveau de l'aire CA3 de l'hippocampe afin de définir le potentiel de repos de la cellule (V_{rest}) et la force motrice du GABA (DFGABA) respectivement, des enregistrements in vitro en cellule attachée et extracellulaire de champs afin de voir si les effets GABAergiques sont associés à une excitation neuronale, l'immunocytochimie et la biochimie afin d'évaluer l'expression des cotransporteurs de chlore (KCC2 et NKCC1), et les reconstructions neuronales afin d'évaluer les possibles altérations morphologiques et synaptiques. En plus, nous réaliserons un prétraitement maternel par la Bumétanide par administration à la mère gestante du diurétique dans l'eau potable 24 heures avant le jour de naissance prévu et évaluerons chez les souris traitées les paramètres physiologiques, morphologiques et comportementaux. L'ensemble de ces techniques et préparations est donc disponible et a été développé, adapté et utilisé par les chercheurs du laboratoire ainsi que des chercheurs d'équipes avec lesquelles nous collaborons.

Ces travaux permettraient de confirmer l'importance centrale d'une dérégulation de l'homéostasie chlorure dans les troubles autistiques, incluant le syndrome de Rett. Fort de ces résultats, le traitement par la Bumétanide apparaîtrait comme un espoir thérapeutique dans cette pathologie, pour laquelle il n'existe pour l'heure aucun traitement.

Bibliographie

- Banerjee et al. *Frontiers in Psychiatry*. 8:3-34 (2012).
Chao et al. *Nature Neuroscience*. 15(2):176-7 (2012).
Duarte et al. *PLoS One*. 8(7):e68851 (2013).
Eftekhari et al. *Science*. 343(6206):176 (2014).
Esteller. *Epigenetics*. 2(1):1 (2007).
Lemonnier et al. *Transl Psychiatry*. 2:e202 (2012).
Percy et al. *Current Opinion in Pediatrics*. 16(6):670-7 (2004).
Tyzio et al. *Science*. 314(5806):1788-92 (2006).
Tyzio et al. *Science*. 343(6171):675-9 (2014).