

## Bourse post-doctorale Appel à projets 2019-2020

Titre du projet  
**Recherche et développement préclinique de thérapies innovantes pour la spasticité.**

### Société présentant le projet

<b>Sigle</b>	
<b>Raison sociale</b>	<b>NSrepair</b>
<b>Adresse</b>	Institut de Neurosciences de la Timone 27 boulevard Jean Moulin 13 385 Marseille CEDEX 05 FRANCE
<b>Directeur</b>	Philippe Marino
<b>Directeur du projet</b>	Philippe Marino
<b>Effectif en région Sud -PACA</b>	3
<b>Courriel</b>	philippe.marino@nsrepair.com
<b>Téléphone</b>	06 99 59 08 42

Responsable de l'équipe/service/unité

Philippe Marino

Responsable du post-doctorant (N+1)

Philippe Marino

# Présentation du projet de recherche

<b>Titre du projet</b>	<b>Recherche et développement préclinique* de thérapies innovantes pour la spasticité.</b>		
<b>Domaine principal</b>	Sciences de la vie et de la santé	<b>Domaine secondaire</b>	Neuropharmacologie# recherche

\***C'est quoi les études précliniques ?** Elles permettent d'identifier des molécules thérapeutiques (recherche préclinique) et de caractériser leur comportement (efficacité, toxicité, pharmacocinétique) dans un organisme vivant (développement préclinique). Elles sont indispensables pour sécuriser et fiabiliser les essais chez l'homme. Ce sont les études que notre nouveau collaborateur conduira. Keep calm and have fun ! La formation à ce nouveau champ de discipline est incluse...

## Qui sommes-nous ?

**NSrepair** est une **entreprise biopharmaceutique, spécialisée dans la recherche préclinique pour les lésions brutales du système nerveux**. Notre expertise porte sur les traumatismes aigus, les accidents vasculaires cérébraux, et les symptômes associés telle que la **spasticité**. Pour ces indications, les activités de l'entreprise se divisent en 2 bras complémentaires :

- **la recherche et le développement pharmacologique# de thérapies innovantes pour la spasticité : activité pour laquelle nous sollicitons cette bourse post-doctorale**
- **la prestation de services en pharmacologie *in vivo* pour l'industrie pharmaceutique**

Concrètement, notre mission est de maximiser les chances de succès des composés thérapeutiques innovants lors des premiers essais chez l'homme.

# **C'est quoi la pharmacologie ?** Partie intégrante des études précliniques, elle recouvre la :

- pharmacodynamie (PD) : ce que fait une molécule à un organisme vivant (efficacité, toxicité)
- pharmacocinétique (PK) : ce que fait l'organisme à une molécule (administration, distribution, métabolisme, excrétion)

## 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.**

---

**L'objectif du projet est de démontrer, en un an, l'efficacité et l'innocuité *in vivo* d'une famille de vecteurs viraux innovants destinés au traitement de la spasticité.**

La **spasticité** est un trouble moteur, fréquemment associé aux lésions neurologiques. Cette conséquence physiologique se caractérise par une augmentation du tonus musculaire et des spasmes. **Elle handicape lourdement 12 millions de patients dans le monde pour lesquels il n'existe aucun traitement satisfaisant.**

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la spasticité, nous avons initié une étroite collaboration avec l'équipe de recherche P3M (Dr. Frédéric Brocard, CNRS, Marseille). Leurs travaux, portant sur la physiopathologie de la motricité, nous ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques innovantes (Boulenguez, Liabeuf et al. 2010; Brocard, Plantier et al. 2016). Une première preuve de concept a été obtenue conjointement (Liabeuf, Stuhl-Gourmand et al. 2017), sur la base de petites molécules chimiques. Conscient des limites de cette approche thérapeutique, notamment liées aux effets secondaires importants, des vecteurs viraux innovants et plus spécifiques, ciblant les calpaïnes, sont actuellement développés. Une première série expérimentale, conduite avec le Dr. Hélène Bras (P3M) nous a permis de résoudre les problèmes techniques.

Notre collaborateur aura la charge de poursuivre ce travail en étudiant la pharmacologie des vecteurs viraux, dans un modèle rat de spasticité induite par transection médullaire. A partir d'adénovirus déjà produits, il devra :

- déterminer la méthode d'administration en accord avec la clinique (stabilité physico-chimique, voie d'abord)
- obtenir la première preuve d'efficacité (preuve de concept\*)
- établir un profil dose-réponse (études PK/PD)
- rechercher la toxicité

Ces données nous permettront de finaliser notre levée de fonds et ainsi, d'accélérer la croissance de l'entreprise, tout en valorisant le brevet issu de l'équipe P3M.

**\*C'est quoi la preuve de concept ?** C'est une démonstration, des données tangibles qui prouve qu'un concept, une idée peut avoir une application réelle en thérapeutique humaine. Pour les entreprises biopharmaceutiques, la preuve du concept c'est de savoir si un composé a le potentiel pour devenir un médicament.

## En quoi le projet est-il innovant ?

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

---

### Dépasser l'état de l'art !

La spasticité est un trouble moteur qui handicape lourdement 12 millions de patients dans le monde. Les traitements actuels ont d'importants effets secondaires et ne soulagent pas de façon satisfaisante cette conséquence physiologique.

**La spasticité est un important besoin médical non satisfait.  
Toutefois, de récentes découvertes pourraient changer cette réalité !**

Les travaux de recherche publiés par l'équipe P3M suggèrent que la spasticité repose sur une hyperexcitabilité des motoneurones en conséquence d'une :

- augmentation du courant sodique persistant (INaP)
- désinhibition liée au dysfonctionnement du co-transporteur KCC2

Concrètement, la protéolyse des canaux sodiques engendre une augmentation de INaP et celle de KCC2 une désinhibition par augmentation du Cl<sup>-</sup> intracellulaire. A l'aide d'outils génétiques, l'équipe P3M a montré que les calpaïnes, endopeptidases à cystéine activées après une lésion médullaire, sont à l'origine de ces 2 phénomènes, lesquels conduisent à l'émergence de la spasticité. Les calpaïnes apparaissent donc comme une cible thérapeutique de choix pour prévenir ou traiter la spasticité.

**A l'heure actuelle, aucune stratégie thérapeutique exploite ce mécanisme innovant.**

C'est dans ce contexte, et en étroite collaboration avec l'équipe P3M, qu'NSrepair place ses activités de R&D. L'objectif est d'apporter une nouvelle solution thérapeutique aux patients spastiques, en développant une famille innovante d'**adénovecteurs** (vecteur adéno-associés, ou AAV) thérapeutiques, bloquant spécifiquement les calpaïnes par **expression d'ARN bloquant** (shRNA).

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

1. Sur le plan scientifique, le projet permettra de confirmer l'hypothèse que les calpaïnes sont à l'origine de la spasticité. Selon le shRNA exprimé par l'adénovecteur, le rôle physiopathologique de chaque isoforme de la calpaïne sera déterminé. Ce travail servira de base aux développements thérapeutiques à venir
2. Sur le plan clinique, le projet apportera aux patients spastiques une nouvelle opportunité thérapeutique plus efficace, d'action plus longue et présentant moins d'effets secondaires
3. Sur le plan commercial : l'aboutissement du projet permettra d'adresser le marché des traitements symptomatiques, lequel est en pleine croissance du fait d'une plus grande sensibilisation des patients, des efforts de recherche, de la modification du style de vie, des progrès dans l'industrie de la santé et de l'augmentation du revenu par habitant dans les marchés émergents. Les principaux chiffres décrivant le marché de la spasticité sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Prévalence (7 principaux marchés mondiaux)	6 Mn
Prévalence (US - monde)	500.000 – 12 Mn
Valorisation du marché symptomatique (US)	2,4 Md \$
Taux de croissance annuel moyen (US)	4,16%, pour atteindre 3,6 Md \$ en 2020

Les bénéfices seront réalisés par la vente de licences exclusives à des entreprises pharmaceutiques. Notre stratégie est de vendre précocement, en fin de phase I/IIa. Ce retour sur investissement permettra, d'une part, de rémunérer le laboratoire public au titre du brevet et, d'autre part, d'appuyer le développement des thérapies de seconde génération et d'adresser d'autres pathologies présentant des mécanismes cellulaires comparables, comme les troubles urologiques et les douleurs neuropathiques.

## Intérêt du projet pour la société de biotechnologie et pour le candidat

### Pour le candidat

L'objectif est de s'immerger dans un environnement translationnel passionnant et unique, qui lie :

- la recherche préclinique, propre aux laboratoires publics
- le développement préclinique, conduit par les entreprises biopharmaceutiques
- les essais cliniques réalisés par les médecins
- la commercialisation et le suivi de thérapies innovantes opérés par les big pharma

En participant à ce projet de R&D, notre collaborateur apprendra à maîtriser la gestion de projets translationnels en recherche appliquée et le management. En tant que membre de l'équipe, il évoluera au contact de chercheurs, cliniciens, et industriels. Cet environnement riche lui permettra de s'ouvrir à de nouvelles opportunités et d'étendre rapidement son réseau professionnel.

### Pour NSrepair

Même si l'entreprise a été fondée sur le service, notre passion est celle du développement thérapeutique. Ce projet vise à accélérer notre programme de R&D interne en nous appuyant sur un collaborateur supplémentaire. Grâce à ses travaux, nous serons en mesure de convaincre des investisseurs de nous accompagner plus avant dans le développement et la vente de cette stratégie thérapeutique innovante. Nous sommes convaincus que c'est notre meilleur levier de croissance.

## Profil de candidat recherché (lister au moins 4 compétences et techniques maîtrisées attendues)

### Certifications

Nous souhaitons que notre futur collaborateur possède déjà les diplômes réglementaires nécessaires à l'expérimentation animale : niveau opérateur/concepteur, pratique chirurgicale. Ce serait un gain de temps appréciable pour le projet.

Être à l'aise et bienveillant envers les animaux de laboratoire, notamment les rongeurs, est indispensable pour ce poste.

Une bonne maîtrise des outils informatiques est également nécessaire.

Tu réunit les caractéristiques suivantes :

- tu es **passionné** par le vivant et les Neurosciences
- tu es **engagé et tenace** : tu ne lâches rien, surtout quand le projet n'évolue pas comme tu l'espérais
- tu as **l'esprit sportif** : tu sais jouer l'équipe
- tu es **communicant** et bon **négociateur**
- tu n'as pas peur de la complexité et du changement : adaptabilité est ton maître-mot
- tu as un solide appétit et tu sais préparer de bons gâteaux : notamment pour ton anniversaire

**I WANT YOU FOR NSrepair!**

## Liste des contrats obtenus au cours des 5 dernières années.

Les contrats réalisés par l'entreprise sont le plus souvent confidentiels. Néanmoins, nous pouvons révéler certaines informations sur la base de publications réalisées. Nous œuvrons actuellement pour 3 types de clients :

- des laboratoires de recherche publics, au travers des SATTs : CONNECTUS, SATT SUD-EST
- des biotechs : ADDEX Therapeutics
- des big pharma : laboratoire IPSEN

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

Former un bon collaborateur prend du temps et nécessite un plein investissement. Ce n'est pas pour le laisser partir. En fonction de la situation financière d'NSrepair et du lien créé, tout sera mis en œuvre pour le garder. Que ce soit pour notre R&D ou pour notre activité de services.

Concernant ce projet, l'ambition de l'année 1 est d'obtenir la preuve de concept. En cas de succès, notre collaborateur aura la charge d'assurer le développement préclinique (en 2 ans) afin de convaincre les médecins et les investisseurs d'évaluer cette nouvelle approche thérapeutique chez l'homme.

## Engagement de la société

Je, soussigné(e), Philippe Marino

\* demande à NeuroSchool d'examiner le présent projet 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 ladite bourse,

\* m'engage à fournir les conditions indispensables au bon déroulement du contrat,

\* m'engage à informer au plus tôt NeuroSchool de toute modification apportée au projet.

Fait à Marseille, le 14/11/2019.

Signature du directeur :

Cachet de la société :



## Modalités

*Documents transmis par voie électronique avant le 14 novembre 2019 minuit à l'adresse suivante : [neuroschool-candidature@univ-amu.fr](mailto:neuroschool-candidature@univ-amu.fr)*

***Joindre en annexe du dossier une présentation détaillée du projet (2 pages max).***

## Annexe 1 : présentation du projet qui sera dirigé et conduit par notre futur collaborateur

En tant que chef de projet il devra, en un an, apporter la preuve de concept pour une famille d'adénovecteurs thérapeutiques destinés aux patients spastiques.

### 1. LE BESOIN

**Epidémiologie** : la spasticité est un trouble moteur, associé aux lésions neurologiques, qui handicape lourdement **12 millions de patients dans le monde**. La prévalence varie selon le type de lésion initiale. Elle atteint 75 % après traumatisme médullaire. **C'est le modèle qui sera mis en œuvre par notre collaborateur.**

**Symptômes** : la spasticité se caractérise par une **augmentation vitesse dépendante du réflexe tonique d'étirement**, associée à une exagération des réflexes ostéotendineux, une augmentation du tonus musculaire et des raideurs. D'autres symptômes complètent ce tableau clinique : des spasmes, des dystonies, des clonies, des réflexes de cisaillement et des postures anormales.

**Diagnostic** : en clinique, il fait intervenir 3 échelles de scores et une évaluation électrophysiologique du réflexe de Hoffmann (H-reflex). **Cette méthode électroneuromyographique sera mise en œuvre par notre collaborateur.**

**Des traitements peu efficaces, aux importants effets secondaires** : la prise en charge des patients est précoce et pluridisciplinaire. Elle fait intervenir la kinésio thérapie, la pharmacologie et la chirurgie en dernier recours.

**Malheureusement, aucun de ces traitements ne soulage de façon satisfaisante les patients et les médicaments ont d'importants effets secondaires. La spasticité représente un important besoin médical non satisfait. C'est la raison d'être des travaux qui seront conduits par notre collaborateur.**

**Contexte économique** : le coût de la prise en charge des patients peut atteindre 230.000 €. Le **marché des traitements symptomatiques est en pleine croissance**, il dépassera 3,6 Md \$ en 2020. **Les travaux de notre collaborateur permettront à NSrepair d'adresser ce marché à forte valeur ajoutée et de devenir leader.**

### 2. ETAT DE L'ART

#### a. Le réflexe d'étirement

La spasticité est « **un trouble moteur caractérisé par une augmentation sensible de la vitesse des réflexes d'étirements toniques, associée à une exagération des réflexes tendineux, liée à l'hyperexcitabilité de l'arc réflexe myotatique...** ». **Le réflexe d'étirement est central dans la physiopathologie de la spasticité.** Il est initié par les fuseaux neuromusculaires qui possèdent une innervation motrice et sensitive. Leur étirement provoque la décharge des fibres nerveuses sensibles « la » qui en sont issues. Le message est transmis par 1 synapse glutamatergique aux motoneurons  $\alpha$  qui innervent le même muscle et entraîne sa contraction. **Le réflexe d'étirement est contrôlé par 4 types d'interneurones inhibiteurs** qui préviennent son exagération. Ces réflexes sont dits « **polysynaptiques** ». Ils sont sous le contrôle des voies descendantes sérotoninergiques (5HT) et noradrénergiques (NA). Ces neurotransmetteurs inhibent les neurones excitateurs des réflexes polysynaptiques, facilitent l'action des interneurones inhibiteurs et ont un effet facilitateur sur les motoneurons.

**La spasticité se caractérise par des réflexes d'étirement hyperexcitables, entraînant une augmentation du tonus musculaire et des spasmes.**

#### b. Physiopathologie

La spasticité émerge plusieurs semaines après l'atteinte. Sous l'effet d'une baisse de l'innervation 5HT et NA, elle résulte d'une augmentation de l'excitabilité des motoneurons et des interneurones, et d'une réduction de l'inhibition présynaptique et réciproque « la », aboutissant à l'**hyperexcitabilité du réflexe d'étirement.**

**Au niveau cellulaire**, 2 mécanismes sont proposés pour l'expliquer : une hyperexcitabilité des motoneurons due à la résurgence des courants sodiques entrants persistants ( $I_{NaP}$ ) (Brocard et al. 2016 Nat. Med.) et une baisse de l'inhibition synaptique liée à une dérégulation des canaux KCC2 (Boulenguez et al., 2010 Nat. Med). Il a été établi que les calpaïnes, protéases à cystéine  $Ca^{2+}$  dépendantes, sont surexprimées après un traumatisme médullaire et sont connues pour cliver à la fois les canaux sodiques afin d'augmenter l' $I_{NaP}$  et le cotransporteur KCC2 conduisant à une désinhibition des motoneurons. **Cela a amené l'équipe du Dr. Frédéric Brocard à considérer les calpaïnes comme une cible thérapeutique de choix.**

#### c. Les traitements pharmacologiques actuels de la spasticité



Ils sont indiqués en cas de restrictions gênantes de la mobilité, et pour atténuer les spasmes et les douleurs. Sur la base des mécanismes physiopathologiques décrits précédemment, on distingue 3 grandes familles de médicaments : les GABAergiques qui rétablissent l'inhibition, les agonistes  $\alpha_2$  adrénergiques centraux qui réduisent l'hyperexcitabilité des interneurons, et les antispastiques d'action périphérique qui bloquent directement la contraction musculaire. Aucun de ces traitements ne soulage de façon satisfaisante la spasticité et ils ont d'importants effets secondaires.

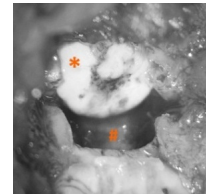
**Dans ce contexte, notre collaborateur devra tester des outils génétiques innovants (développés par l'équipe P3M) destinés à inhiber les conséquences pathologiques de l'activation de la calpaïne après lésion médullaire.**

**Ils devront diminuer spécifiquement l'hyperexcitabilité des motoneurons innervant les muscles spastiques afin de rétablir la motricité. Le bénéfice d'une telle approche est de limiter les effets secondaires.**

### 3. UN PROJET REALISTE

#### a. Le modèle

La spasticité sera induite chez le rat par transection complète de la moelle épinière en regard de la 8<sup>ème</sup> vertèbre thoracique (T8), (photo ci-contre ; \*moelle épinière transectée, #face dorsale du corp vertébral de T8). Dans ce modèle, la spasticité est établie 4 semaines après lésion.

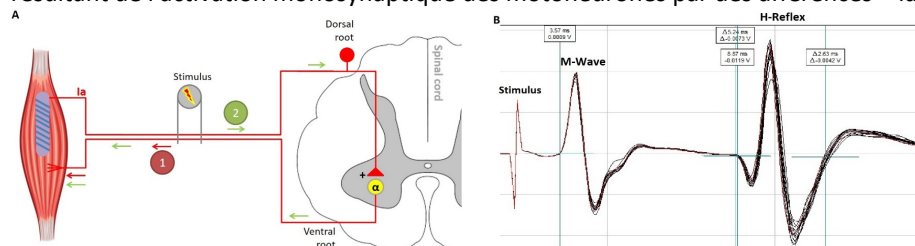


#### b. Administration des adénovecteurs

Des virus adéno-associés (AAV) de sérotype 9, couplés à la GFP et exprimant des ARN bloquant (shRNA) ciblant les sous-unités 1 et/ou 2 de la calpaïne seront administrés. Ces adénovecteurs ont été préparés par l'équipe P3M (Dr. Hélène Bras) et sont déjà en cours d'évaluation. Ils seront administrés par voie intrathécale ou intramusculaire. Notre collaborateur aura la charge de confronter les différentes méthodes d'administration avec la réalité de la clinique, et de déterminer les doses, volumes, et formulations les plus adaptées.

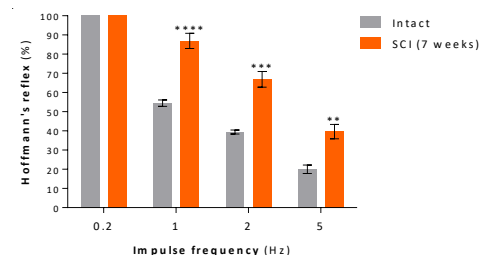
#### c. L'évaluation de la spasticité

L'émergence de la spasticité, et son évolution après traitement, sera étudiée par électroneuromyographie : le réflexe d'Hoffmann (H-reflex) est utilisé pour évaluer l'excitabilité motoneuronale induite par les afférences primaires (Ia) chez le rat spastique. Les électromyogrammes montrent typiquement deux réponses, une onde M initiale (Fig. 1B) résultant de l'activation directe des axones moteurs (Fig. 1A-1) et une onde H retardée (Fig. 1B) résultant de l'activation monosynaptique des motoneurons par des afférences « Ia ». (Fig. 1A-2).



**Figure 1. Le réflexe d'Hoffmann.** (A) Méthode pour induire le réflexe d'Hoffmann. 1: activation directe des axones moteurs, 2: activation monosynaptique du motoneurone ( $\alpha$ ) par les afférences « Ia ». (B) Exemple d'enregistrement électromyographique.

L'amplitude de l'onde H est atténuée par des activations répétées à des fréquences  $> 0,2$  Hz, avec une réduction maximale à 5 Hz chez des rats intacts (figure ci-contre). Le dépresseur fréquence dépendante du H-reflex est progressivement réduit chez les individus lésés. Cet effet est un corrélat fiable du développement de la spasticité. Son rétablissement nous permettra de d'objectiver l'efficacité de la thérapie génique. Ces évaluations seront faites au niveau du flexor digitorum brevis et du gastrocnémien, avant traitement, pour démontrer la spasticité des animaux, puis toutes les semaines après traitement sur une durée de 3 mois.



#### d. Immunohistochimie et microscopie confocale

Ces études seront réalisées sur la région lombaire de la moelle épinière, et dans les muscles, afin de localiser et de quantifier les adénovecteurs (GFP), et de quantifier l'expression de différentes protéines (calpaïne, KCC2, canaux sodiques). Les animaux traités génétiquement et contrôles seront comparés au cours du temps.

**Finalement, notre collaborateur participera à la rédaction de la brochure destinée aux investisseurs et prendra part à l'ensemble des réunions scientifiques avec nos experts industriels, médecins et chercheurs.**