

## Bourse post-doctorale Appel à projets 2020-2021

### Titre du projet

Développement d'un nouveau modèle d'intoxication progressive des neurones mimant les maladies dégénératives in vitro.

### Société présentant le projet

<b>Sigle</b>	
<b>Nom complet</b>	NEURON EXPERTS
<b>Adresse</b>	2, Rue Odette Jasse Cité de la Cosmétique 13015 MARSEILLE
<b>Directeur</b>	Rémy STEINSCHNEIDER
<b>Directeur du projet</b>	Dorothee Buttigieg
<b>Effectif en région Sud -PACA</b>	9
<b>Courriel</b>	contact@neuronexperts.com
<b>Téléphone</b>	04 86 01 11 95

Responsable de l'équipe/service/unité  
Rémy Steinschneider

Responsable du post-doctorant (N+1)  
Elodie Gras Lavigne

# Présentation du projet de recherche

<b>Titre du projet</b>	Développement d'un nouveau modèle d'intoxication progressive des neurones mimant les maladies dégénératives in vitro		
<b>Domaine principal</b>	Sciences de la vie et de la santé	<b>Domaine secondaire</b>	Neurosciences

## 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.*

NEURON EXPERTS a développé des cultures de neurones mimant les maladies dégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson. Les modèles actuels consistent à intoxiquer les neurones par un stress aigu, provoquant la dégradation des neurones dans les 48 heures. Bien que ces modèles soient prédictifs pour sélectionner les molécules issues de l'industrie pharmaceutique protégeant les neurones, ils ne miment pas le caractère progressif de ces maladies.

Ce projet consiste à développer une intoxication progressive des neurones par des oligomères de la protéine Tau et de l' $\alpha$ -synucléine pour obtenir une dégénération progressive des neurones.

Les inclusions neuronales de la protéine Tau hyperphosphorylée sont une caractéristique pathologique de la maladie d'Alzheimer. De nombreuses études in vitro suggèrent que la forme oligomère de la protéine Tau se propage de neurone en neurone, induisant une hyperphosphorylation de Tau, une atrophie des prolongements, une diminution des synapses et une mort progressive des cellules après une semaine d'incubation.

Il en est de même pour l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine pour la maladie de Parkinson. La propagation entre neurones de l' $\alpha$ -synucléine est suggérée comme le mécanisme sous-jacent par lequel les agrégats se répandent dans le cerveau. Il a été démontré in vitro que l'incubation durant 14 jours de fibrilles préformées d' $\alpha$ -synucléine entraîne une mort neuronale.

Le but de ce travail consistera à développer des oligomères d' $\alpha$ -synucléine ou de Tau afin d'intoxiquer les cultures de neurones corticaux et hippocampiques. La propagation de la phosphorylation de ces protéines ainsi que la mort cellulaire seront analysées en immunofluorescence.

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

Sur le plan scientifique, ces modèles in vitro permettraient d'obtenir une plus grande progressivité de la propagation de la maladie, donc plus proche des modèles in vivo et de la physiopathologie. Ainsi il sera possible d'étudier la progression de ces maladies neurodégénératives, de l'induction de l'hyper phosphorylation des protéines à la perte des synapses et de la mort des neurones. La décomposition de ces étapes nous permettra de bloquer cette propagation par des molécules de références activant les différentes voies de survie des neurones et d'analyser s'il est possible de reverser le phénomène de propagation de ces maladies.

L'intérêt pour NEURON EXPERTS, société de service pour l'industrie pharmaceutique, est de pouvoir proposer à ses clients un modèle progressif de dégénération mimant les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, donc plus physiologique. Ainsi, les molécules neuro-protectrices issues de l'industrie pharmaceutique pourront être testées avant l'intoxication par les protéines Tau ou l' $\alpha$ -synucléine, en préventif, mais également à différentes phases de développement de ces maladies. La connaissance plus fine du développement de ces maladies in vitro permettra de mieux caractériser les effets protecteurs de ces molécules.

### **En quoi le projet est-il innovant ?**

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

Ce projet permettra à Neuron Experts de développer le premier modèle in vitro, dédié au « screening » de molécules, mimant des maladies neurodégénératives progressives, se rapprochant ainsi de la physiopathologie des maladies de Parkinson ou d'Alzheimer. Ce modèle devrait donc être plus prédictif que les modèles existants actuellement pour le screening. De par sa progressivité de la neurodégénérescence ce modèle devrait également être un bon outil d'analyse pour étudier le blocage de la propagation des oligomères phosphorylés de la protéine Tau ou de l' $\alpha$ -synucléine, voir même la récupération des neurones après traitement par des molécules clients. De plus, ce modèle pourra cibler plus facilement le mode d'action des molécules testées puisque les différentes étapes de la dégradation des neurones pourront être étudiées.

Ces modèles pourront être basés sur des cultures de rongeurs mais également des neurones humains issus de cellules humaines reprogrammées. Cette partie pourra être menée en collaboration avec un laboratoire académique spécialisé dans la reprogrammation cellulaire, la différenciation en neurones corticaux, mésencéphaliques, dopaminergiques et spécialisée dans l'étude des maladies neurodégénératives type Alzheimer ou Parkinson.

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

- 2015 – Bourse post doctorale AMIDEX, suivie par l'embauche en CDI de la postulante, Mme Nathalie PY
- 2016-2017- Subvention de la région (PRI) et la BPI, à hauteur de 120 000 €

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

- Maîtriser les primo cultures de neurones (dissection de cortex, hippocampe d'embryon de rat ou de souris et mise en culture)
- Maîtriser les cultures de neurones humains issus d'IPS
- Connaissance des mécanismes impliqués dans les maladies neurodégénératives, en particulier Parkinson et Alzheimer
- Maîtriser les marquages immunologiques en fluorescence
- Maîtriser la technique des western blots
- Maîtriser les techniques de biologie moléculaire
- Maîtriser l'anglais
- Travailler en autonomie

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

L'intérêt pour la société Neuron Experts sera de pouvoir développer de nouveaux modèles cellulaires intéressant l'industrie pharmaceutique sans assumer seul le cout de ce développement. A la fin de ce projet, si il est réussi, Neuron Experts pourra proposer à ces clients de nouveaux modèles de culture de neurones mimant les maladies de Parkinson et d'Alzheimer de manière progressive et de tester les composés clients.

Ce projet permettra également de promouvoir les interactions existant entre l'université et Neuron Experts.

Pour le candidat, le premier intérêt sera d'avoir une expérience professionnelle dans le une société de recherche privée. Durant ce contrat, le candidat aura appris à développer un modèle cellulaire fondamental pouvant être appliqué directement à l'industrie privée.

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

Si le candidat réussi son intégration dans la société et démontre sa capacité à mener à bien un projet de développement d'un modèle permettant à Neuron experts de signer de nouveaux contrats avec les sociétés pharmaceutiques, il y aura la possibilité d'être engagé en CDI.

## Engagement de la société

Je, soussigné, Rémy Steinschneider, PhD, Président de de Neuron Experts.....  
\* 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 13 novembre 2020.

Signature du directeur :



Cachet de la société :

**Neuron Experts SAS**

Cité de la cosmétique

2 rue Odette Jasse

13015 Marseille, France

Tel : 04 86 01 1195

RCS Marseille : 505 252 007

N° de TVA intracom. FR 83 505 252 007

## Modalités

*Documents transmis par voie électronique avant le **15 Novembre 2020** 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 de la société Neuron Experts

### Titre « Développement d'un nouveau modèle d'intoxication progressive des neurones mimant les maladies dégénératives in vitro »

Neuron Experts SAS est une société de service pour l'industrie pharmaceutique spécialisée dans les cultures de neurones. Elle a développé des cultures de neurones de rongeur ou humain mimant les maladies neurodégénératives comme Parkinson, Alzheimer, la Sclérose Latérale Amyotrophique, ... Ces modèles in vitro consistent, en général, à intoxiquer les neurones par des toxines, qui après 24 ou 48 heures induisent une mort neuronale généralement irréversible. Ils sont suffisamment prédictifs pour pouvoir évaluer l'efficacité des molécules, issues de l'industrie, ayant des propriétés neuro protectrices et d'en définir les concentrations efficaces. Cependant, de par la toxicité aiguë de ces modèles, il est difficile de déterminer quelles sont les voies de survie cellulaire que les molécules testées stimulent pour protéger les neurones.

Des études récentes ont montré que l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine ( $\alpha$ -syn) était impliquée dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson. Le mauvais repliement et l'agrégation d' $\alpha$ -syn serait responsable de ces « *synucléinopathies* »(1). Les agrégats anormaux dont la nature est inconnue pour le moment, peuvent se propager progressivement de neurones en neurones, conduisant à une neuro-inflammation et une neuro-dégénération progressive (2). En culture, l'incubation de fibrilles préformées (PFF) à base de protéines  $\alpha$ -syn recombinantes a été utilisée pour étudier le mécanisme par lequel les agrégats se propagent dans les neurones.

Il en est de même pour les inclusions neuronales de la protéine Tau hyperphosphorylée qui sont une caractéristique pathologique de la maladie d'Alzheimer. Des études précliniques récentes ont montré que la protéine Tau mal repliée et appliquée de manière exogène peut être internalisée par des cellules (3) et peut se propager progressivement via des réseaux interconnectés dans le cerveau (4). De plus, in vitro, des études ont montré que la protéine Tau peut être libérée de manière différentes par les neurones primaires de rat (5). Il a été supposé que la transmission de la protéine Tau défaillante est médiée par la libération, l'absorption, et le trafic dans les synapses des neurones, ce phénomène se faisant très progressivement.

Le but de ce projet est donc de développer de nouveaux modèles d'intoxication de neurones permettant d'obtenir une intoxication progressive et plus physiologique en utilisant des PFFs ou des oligomères de Tau pour induire une dégénérescence progressive des neurones en culture. Les 2 modèles seront développés en parallèle.

La première partie de ce projet consistera à obtenir des oligomères de Tau à partir des monomères de Tau et des PFFs à partir de monomère d' $\alpha$ -syn. Ces monomères ou ces oligomères étant commercialisés, il faudra rechercher le bon compromis dans les phases d'agitation et de sonication afin d'obtenir les fractions de protéines toxiques. Cette partie implique donc la mise en culture de neurones primaires de rongeurs (rat ou souris), est de réaliser des cinétiques d'intoxication afin de déterminer les meilleurs paramètres pour obtenir une toxicité progressive atteignant 50 % des neurones après 10 à 15 jours d'incubation.

La deuxième partie du projet consistera à analyser les différentes étapes conduisant à la mort des neurones après intoxication. Pour cela, des cultures de neurones seront établies selon le protocole validé dans la première partie. Après intoxication, les neurones seront fixés à différents temps de culture et différents paramètres seront analysés en immunofluorescence comme la concentration en agrégats endogènes, le taux de phosphorylation des protéines Tau et  $\alpha$ -syn, la densité des synapses, la longueur des prolongements des neurones et enfin la mort des neurones. Ces analyses se feront avec le système de microscopie automatique « In Cell 2200 » (GE healthcare) et le programme d'analyse d'image associé. Une cinétique d'apparition (ou de disparition) des différents paramètres sera réalisée afin d'analyser les mécanismes impliqués dans la mort des neurones dans ces différents systèmes d'intoxication.

La troisième partie consistera à tester des molécules de références, connues pour avoir des effets neuroprotecteurs, dans les différents modèles et d'analyser l'apparition ou la disparition des différents paramètres de la survie des neurones retenue dans la partie 2. Ces résultats permettront de mieux connaître les modes d'actions de ces molécules. Pour une ou deux molécules ayant montré des résultats intéressants, des nouvelles expériences d'intoxication seront réalisées en ajoutant des bloqueurs des différentes voies de protection des neurones (ERK1/2, PIK3, BCL2, autophagie, ...).

L'ensemble de ces résultats pourront être également reproduits sur des cultures de neurones humains issus de cellules reprogrammées, en collaboration avec une équipe académique.

L'intérêt de ce projet pour Neuron Experts est d'obtenir des modèles cellulaires reproductibles mimant les maladies de Parkinson et d'Alzheimer de manière plus progressive que les modèles utilisés jusqu'à présent. Ces modèles permettront de tester des molécules de nos clients avec plus de paramètres et ainsi de pouvoir obtenir un profil de mode d'action pour chaque composé. Ces résultats seront précieux pour nos clients et leurs permettront de mieux s'orienter par la suite sur des tests in vivo.

1-Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-840.

2- Wolozin B, Behl C. Mechanisms of neurodegenerative disorders: part 1: protein aggregates. *Arch Neurol* 2000;57:793-796.

3-Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, Steinberg JI, Margittai M, Kaye R, Zurzolo C, Di Paolo G, Duff KE. Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* 2013 ;288:1856-1870.

4-Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, Probst A, Winkler DT, Reichwald J, Staufenbiel M, Ghetti B, Goedert M, Tolnay M. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:9535-9540.

5-Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, Hanger DP. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 2013;14:389-394.