

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 rongeurs ou humains mimant les maladies neurodégénératives comme Parkinson, Alzheimer, la Sclérose Latérale Amyotrophique, ... Ces modèles *in vitro* consistent, en général, à traiter les neurones par des toxines, qui, après 24 ou 48 heures, induisent une mort neuronale irréversible. Ils sont suffisamment prédictifs pour pouvoir évaluer l'efficacité des molécules, issues de l'industrie, ayant des propriétés neuro-protectrices à des concentrations efficaces. Cependant, de par la toxicité aiguë de ces modèles, il est difficile d'analyser les voies de survie cellulaire que les molécules testées stimulent pour protéger les neurones.

Des études récentes ont montré que l'agrégation de l' α -synucléine (α -syn) était impliquée dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson. Le mauvais repliement et l'agrégation d' α -syn seraient 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 ces fibrilles préformées (PFF) à base de protéines α -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 ont montré que la protéine tau mal repliée appliquée de manière exogène pouvait être internalisée par des cellules (3) et se propager progressivement via des réseaux interconnectés dans le cerveau (4). De plus, *in vitro*, des études ont montré que la libération de Tau est finement régulée dans les neurones primaires de rat (5). Il est supposé que la transmission de la protéine tau défaillante est médiée par la libération, l'absorption, et le trafic dans les vésicules synaptiques neuronales, 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 de tau et d' α -syn, dans le but d'obtenir une dégénérescence progressive des neurones en culture. Les 2 modèles seront développés en parallèle.

La première partie de ce projet sera de mettre au point l'intoxication des neurones dopaminergiques issus d'embryons de rat par des PFFs d' α -syn et l'intoxication et l'intoxication des neurones corticaux issus d'embryons de rat par des PFFs de Tau. Cette partie nécessitera la dissection et la mise en culture de deux types de neurones issus d'embryons de rat et la réalisation d'une cinétique d'intoxication afin de déterminer les

meilleurs paramètres pour obtenir une toxicité progressive de 50% des neurones après 10-15 jours d'incubation.

La deuxième partie consistera à analyser les différentes étapes aboutissant 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 les agrégats endogènes, la phosphorylation des protéines tau et α -syn, la densité des synapses, la longueur des prolongements des neurones et enfin la mort des neurones (expression des protéines impliquées dans l'apoptose). Ces analyses se feront avec le système de microscopie automatique « In Cell 2200 » (GE healthcare) et le programme d'analyse d'image. Une cinétique d'apparition (ou de disparition) des différents paramètres sera réalisée afin d'analyser la mort des neurones dans ces deux systèmes d'intoxication.

La troisième partie consistera à tester des molécules de référence, 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 retenus dans la partie 2. Ces résultats permettront de mieux connaître les modes d'action de ces molécules. Sur une ou 2 molécules ayant donné des résultats intéressants, des nouvelles expériences d'intoxication seront réalisées avec des bloqueurs des voies de protections des neurones (ERK1/2, PIK3, BCL2, autophagie, ...).

L'ensemble de ces résultats pourra être également analysé sur des cultures de neurones humains issus de cellules souches induites à la pluripotence, 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. α -Synuclein in Lewy bodies. Nature 1997;388:839-840.

2- Wozolin 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.