



UTILISATION DES CARACTÉRISTIQUES DE PHÉNOTYPES EXPRIMANT PRÉCOCEMENT LA MALADIE DANS UN MODÈLE ZEBRAFISH DE SLA POUR QUE LE CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE DÉTECTE LES PETITES MOLÉCULES NEUROPROTECTRICES.

Tennore M.Ramesh, UK

Subvention : € 30 000

La SLA est une maladie neurologique de l'adulte causée par la dégénérescence des motoneurones ayant une incidence de $\sim 1/1000$. Approximativement 80% des cas sont mortels dans un délai de cinq ans après diagnostic. Il n'y a aucun traitement et le seul médicament approuvé Riluzole, a un effet mineur sur la progression de la maladie et la survie du patient. Une forme familiale de SLA provoquée par des mutations sur le gène SOD1 n'est pas distinguable de la forme sporadique de SLA. Malgré des recherches menées depuis plus de deux décennies, le mécanisme exact de la toxicité du mutant Sod1 dans la SLA est inconnu. La mutation Sod1 a permis de créer des modèles de drosophiles, souris et rats. En dépit de l'utilité de ces modèles, chacun a ses inconvénients :

Les modèles de souris sont fortement innés, et quelques lignes expriment des niveaux très élevés de protéine mutante, ce qui peut ne pas refléter exactement l'état humain. En dépit de leur disponibilité, les modèles de souris ne sont pas appropriés au criblage de molécules, en raison des coûts, de l'espace et du temps requis. Le criblage de 2000 molécules dans le modèle de souris exigerait plus de 20 ans (à raison de 100 molécules par an) et nécessiterait des financements colossaux.

Le modèle de Drosophile présente bien une perte de motoneurones mais non la faiblesse progressive ou la mort prématurée.

La disponibilité de modèles animaux permettant le criblage de drogue à moyen débit est cependant critique pour identifier rapidement les agents modifiant la maladie et fournir également des outils pour mieux comprendre le mécanisme de neurotoxicité.

Le modèle de zebrafish de SLA est un modèle translationnel idéal, permettant à des chercheurs d'entreprendre des criblages à grande échelle, ce qui serait difficile, sinon impossible, avec de plus grands vertébrés tels que des souris. La transparence des embryons permet de visualiser les organes internes à un niveau unicellulaire en utilisant des marqueurs fluorescents (Fig-1) et les alevins éclosent dans un délai de 72 heures après fécondation (haf).

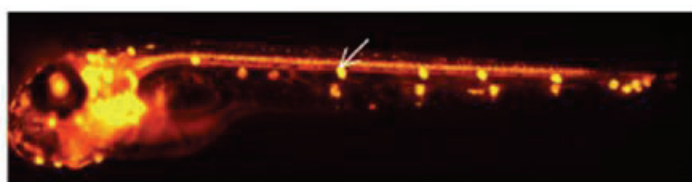


Fig-1: Mutant Sod1 induces cellular stress: G93ROs10 larvae show induction of Hsp70-DsRed in the brain, spinal cord and neuromasts (arrow)



Nous pouvons visualiser et réaliser des expériences d'électrophysiologie complexe sur les seuls neurones moteurs et sur d'autres cellules spinales chez les animaux vivants. Nous pouvons analyser le devenir de cellules, les axones, les synapses et le comportement des motoneurones.

Beaucoup de maladies neurodégénératives sont identifiées par l'accumulation de protéines à repliement anormal qui portent préjudice à la connectivité et à la plasticité neuronales, et déclenchent les mécanismes d'apoptose. Ces agrégats peuvent être composés de complexes oligomères de structures secondaires non-natives peu solubles dans l'eau ou les solvants détergents. La SLA fait partie de cette catégorie de maladie en raison de l'apparition d'agrégats de protéine dans la moelle épinière. Une des premières réactions des cellules aux agrégats de protéines anormales est l'induction d'un choc thermique pour permettre aux molécules chaperonne d'essayer de réparer les protéines endommagées, bien que ce ne soit pas toujours faisable ni productif. Néanmoins, la réponse des molécules chaperonnes fournit une bonne lecture de la pathophysiologie cellulaire. Le stress oxydatif et l'excitotoxicité peuvent générer leur toxicité en modifiant les protéines, conduisant à leur agrégation.

Notre modèle de zebrafish de SLA sert de modèle de translation idéal pour le criblage de drogue grâce à la lecture phénotypique embryonnaire précoce de l'analyse. Nous avons déjà produit un zebrafish transgénique exprimant des formes de mutations de Sod1 qui présentent les caractéristiques de la SLA. Lors de l'identification des lignes transgéniques, nous avons constaté que les poissons portant les mutations Sod1 ont généré une réponse de choc thermique indépendante du choc thermique (désigné sous le nom de l'induction de Sod1mut Hsp70). Ceci suggère que les poissons contenant le mutant Sod1 présentent un stress cellulaire chronique qui peut affecter la physiologie neuronale, et qui mène par la suite à la mort des motoneurones dans la SLA. Nous proposons d'employer cette réponse chronique de mutSod1 hsp70 comme lecture de la toxicité du mutant Sod1. Dans cette proposition nous prévoyons de caractériser entièrement l'induction de Sod1mut Hsp70 et les changements de choc thermique induit dans l'induction Hsp70 endogène dans la moelle épinière des mutants Sod1.

Notre zebrafish transgénique fournira les lectures appropriées pour le criblage de drogue et permettra :

- un criblage de molécules basé sur l'induction spécifique du mutant Sod1 r du promoteur Hsp70 lié à l'expression de Dsred pour identifier les molécules qui changent la toxicité du mutant Sod1.
- un criblage secondaire de validation pour détecter et mesurer les changements de Hsp70 endogène, basé sur la plus grande sensibilité du mutant Sod1 transgénique au stress thermique après traitement par chocs thermiques.

Nous prévoyons d'utiliser cette lecture originale de stress cellulaire pour constituer une banque de molécules incluant un grand nombre de molécules déjà approuvées. Si l'une d'entre elles était prometteuse, il y aurait ainsi matière à commencer rapidement des tests cliniques.





ÉQUIPE

Tennore M.Ramesh est un scientifique avec une large expérience aussi bien en milieu universitaire, qu'en entreprise ou en association. Il a plus de 14 ans d'expérience in vivo en génomique fonctionnelle, pharmacologie, et toxicologie du développement de médicaments. Il a créé le programme de recherche à l'institut de développement de thérapie de la SLA, Cambridge, Etats-Unis et a été son dirigeant scientifique de 2000 jusqu'en 2003. Il a développé le premier modèle zebrafish de maladie neurodégénérative de l'adulte.

Le département de neurosciences est basé à l'École de Médecine et des sciences biomédicales de l'université de Sheffield et collabore avec le Centre de Conseil en Recherche Médicale pour la génétique développementale et biomédicale. Un nouveau centre de recherches consacré à la recherche sur la SLA, dirigé par le professeur Pamela Shaw, chercheur de renommée mondiale, inclut un laboratoire de criblage de drogue à l'institut de Sheffield pour les neurosciences translationnelles (SITraN). Son ouverture est programmée pour l'été 2010.

Le but global de ces deux centres est de traduire la recherche fondamentale en nouvelles thérapies pour les maladies neurodégénératives, en combinant et en intégrant les forces des scientifiques et des cliniciens avec l'expertise en biologie moléculaire/cellulaire, modèles animaux précliniques, et neurologie clinique.

Dr. Tennore M. Ramesh,
DVM, PhD, Principal Investigateur



Ms. Natasha Redhead,
Etudiante BMedSci Medical.





Modèle transgénique de poisson zèbre pour le screening de molécules thérapeutiques

Appel à Projets 2010

Subvention: 30 000 €

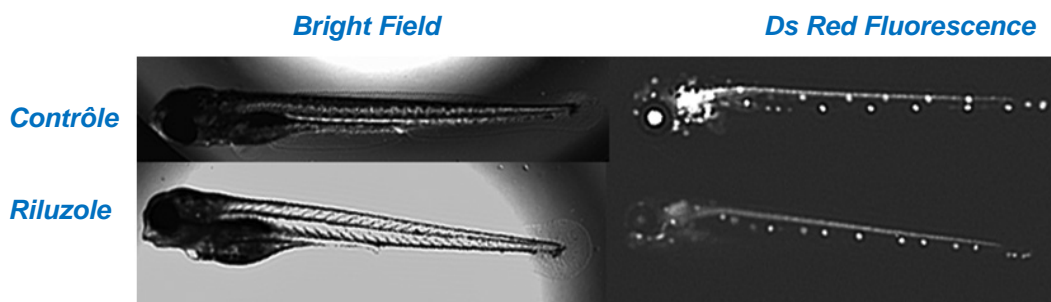
Durée du Projet: 1 an

Investigateur: Tennore Ramesh, Université de Sheffield, Royaume Uni

Point sur les résultats - Décembre 2012

Le poisson zèbre est un nouveau modèle utilisé dans la recherche dans la SLA, il présente de nombreux avantages par rapport aux modèles murins : les manipulations génétiques sont plus simples, les larves sont transparentes, permettant d'observer directement in vivo le développement du système nerveux. Ce modèle offre de plus la capacité de tester un grand nombre de molécules compte tenu de la possibilité d'élever un très grand nombre de poissons et d'évaluer rapidement l'effet d'un traitement.

Notre modèle de poisson SLA a été mis au point avec succès, les lignées de poisson transgéniques sont stables, la rapidité et la qualité du test ont été considérablement augmentées. Nous avons réussi à passer d'une capacité d'analyse de lots de 25 poissons non génotypés par molécule testée à des lots de 2-3 poissons génotypés. L'analyse se fait par fluorescence (photo) sur un seul embryon contre 5 auparavant. Le modèle validé permet de détecter avec 100% de fiabilité une molécule neuroprotectrice, avec seulement 8% de faux positifs.



Réduction du stress neuronal chez les embryons