



Remise de chèques d'un montant total de 44 000 euros dans le cadre de la 10^e édition de l'action Espoir en tête des Rotary Clubs luxembourgeois

Organisée pour la 10^e année, l'action Espoir en tête, initiée par les Rotary Clubs luxembourgeois, a permis de récolter 44 000 euros de dons en faveur de la recherche au Luxembourg sur les maladies neurodégénératives. Depuis la mise en place de ce projet commun des rotariens luxembourgeois en 2013, un total de 683 000 euros a pu être collecté pour soutenir 21 projets de recherche différents au Luxembourg.

L'action Espoir en tête permet chaque année de récolter des dons via l'organisation d'avant-premières et de projections d'exception dans les cinémas Kinopolis du Kirchberg et de Belval.

En 2024 et pour la première fois, l'action a pu mettre en avant un film luxembourgeois, « **Renard et lapine sauvent la forêt** » produit par DOGHOUSE FILMS, SUBMARINE et WALKING THE DOG et distribué au Luxembourg par TARANTULA DISTRIBUTION. Invités le 6 octobre 2024 par les Rotary Clubs luxembourgeois, quelque 1 850 spectateurs ont répondu présents. Huit euros de chaque place vendue 16 euros ont été reversés à la recherche au Luxembourg sur les maladies neurodégénératives.

Ce public a ainsi permis, avec l'appui d'autres donateurs, de récolter 44 000 euros. Une somme qui financera deux projets de recherche, soutenu chacun à hauteur de 25 000 respectivement 19 000 euros, le premier projet concernant le rôle des amyloïdes issus du microbiote sur le déclenchement de l'agrégation protéique liée aux maladies neurodégénératives, le second l'étude du rôle du transfert des mitochondries et lysosomes par les tunneling nanotubes dans les maladies neurodégénératives.

Le rôle des amyloïdes issus du microbiote sur le déclenchement de l'agrégation protéique liée aux maladies neurodégénératives

Savoir si les petites protéines dérivées du microbiome peuvent ensemençer des amyloïdes liés à la neurodégénérescence est d'une importance capitale car cela pourrait révéler des liens causaux entre des microorganismes spécifiques et la pathogenèse de maladies neurodégénératives. Ainsi, les petits amyloïdes dérivés du microbiome présentent un potentiel significatif en tant que nouveaux biomarqueurs pour le pronostic

et le diagnostic des maladies, ainsi que des cibles potentielles ou des guides pour des interventions thérapeutiques précoces. Avant que de telles applications puissent être développées, une vérification moléculaire détaillée et une compréhension mécanistique sont nécessaires pour déterminer comment et dans quelle mesure les petites protéines microbiennes déclenchent le mauvais repliement et l'agrégation des amyloïdes humains critiques.

Ce projet est le fruit d'une collaboration interdisciplinaire entre les équipes neuroinflammation du « Luxembourg Center for Systems Biomedecine (LCSB) », le « Department of Physics and Material Science » de l'Université de Luxembourg et du « Department of Medecine and Genetics » de la Stanford University aux Etats Unis sous la direction du Professeur Paul Wilmes (Luxembourg Centre for Systems Biomedecine (LCSB), Université du Luxembourg). La durée du projet est estimée à 12 mois.

L'étude du rôle du transfert des mitochondries et lysosomes par les tunneling nanotubes dans les maladies neurodégénératives

Le financement de ce projet permettra d'améliorer notre compréhension du rôle de la formation des TNTq entre les neurones et les microglies, et en particulier du transfert fonctionnel des mitochondries et des lysosomes via ces structures dans le contexte de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Comprendre le rôle du transfert mitochondrial et lysosomal via les TNTs sera ensuite exploité pour développer des diagnostics ainsi que de nouvelles voies thérapeutiques pour ces troubles neurodégénératifs. Enfin, nous pensons que les résultats de ce projet serviront de catalyseur pour d'autres demandes de subventions et propositions de projets sur les TNTs à l'avenir.

Participent à ce deuxième projet le « Luxembourg Center for Systems Biomedecine (LCSB) » et le Laboratoire National de Santé (LNS) sous la direction du professeur Michael T. Heneka et du Dr Dimitri Budinger du LCSB. La durée du projet est estimée de 6 à 9 mois.

Un travail d'équipe

Tous les Rotary Clubs luxembourgeois sont fiers d'avoir une nouvelle fois pu contribuer avec cette action commune à la recherche au Luxembourg sur les maladies neurodégénératives et remercient leurs partenaires DOGHOUSE FILMS, SUBMARINE, WALKING THE DOG, TARANTULA DISTRIBUTION et KINÉPOLIS pour leur soutien efficace.

Une nouvelle édition est d'ores et déjà prévue en 2025 et vous pouvez faire un don à l'Association Luxembourgeoise des Œuvres du Rotary avec la mention « Espoir en tête » sur le compte bancaire IBAN LU94 0081 7737 4700 1003 (BLUXLULL).

Plus d'infos sur www.espoir-en-tete.lu

Contact :

Rotary Clubs du Luxembourg
E-mail: info@espoir-en-tete.lu

Descriptif détaillé par les directeurs et équipes des projets

Rôle des amyloïdes issus du microbiote sur le déclenchement de l'agrégation protéique liée aux maladies neurodégénératives

Contexte

Des changements dans le microbiome humain précèdent les symptômes de la neurodégénérescence mais les mécanismes reliant le microbiome aux voies de la maladie sont non résolus à ce jour. Nous souhaitons tester l'hypothèse selon laquelle des petites protéines issues du microbiome sont amyloïdogènes et déclenchent l'agrégation de protéines humaines telles que l' α -synucléine (maladie de Parkinson), la protéine β -amyloïde ($A\beta$) et la protéine tau (maladie d'Alzheimer).

Les protéines amyloïdes se replient mal et s'agrègent en fibrilles insolubles ou en plaques caractérisées par des structures riches en feuillets β parallèles. Une fois formés, les agrégats se propagent de manière prionique d'une cellule nerveuse à l'autre. L'événement initial peut impliquer des agents étrangers tels que des protéines amyloïdes non humaines, et cela peut se produire en dehors du cerveau, notamment dans le tractus gastro-intestinal.

Les amyloïdes dérivés du microbiome, tels que la protéine curli (impliquée dans la formation de biofilms bactériens et produite par les Enterobacteriaceae), peuvent causer le mauvais repliement, l'agrégation et la propagation des amyloïdes humains pathogènes comme l' α -synucléine dans des modèles murins humanisés. La capacité du microbiome à produire des protéines ayant des propriétés amyloïdogènes dans la gamme de taille typique des protéines est ainsi établie. Cependant, le microbiome humain encode et exprime également un ensemble diversifié de petites protéines sans fonction ou domaine connu. Une fraction significative de ces petites protéines est sécrétée par les microbes et a le potentiel d'influencer l'hôte humain. De plus, elles se trouvent dans une gamme de tailles typiquement observée pour les fragments amyloïdogènes humains, par exemple, les isoformes $A\beta$ de 40 et 42 acides aminés. Cependant, le potentiel amyloïdogène de ces petites protéines et leur potentiel à agir comme des semences pour l'agrégation des amyloïdes humains restent à déterminer.

Données préliminaires

Sur la base de 467 537 séquences de petites protéines dérivées du microbiome, un pipeline bioinformatique a été conçu pour identifier les petits amyloïdes potentiels en collaboration avec le groupe du Prof. Ami Bhatt de l'Université de Stanford (États-Unis). Globalement, le pipeline a prédit que plus de 77,5 % des séquences de petites protéines contiennent des fragments amyloïdogènes. La liste résultante de petites protéines amyloïdogènes a été réduite à un sous-ensemble représentatif de 28 séquences candidates utilisées pour les prédictions structurelles in silico à l'aide de l'outil de prédiction structurelle très récent AlphaFold3 (alphafoldserver.com). De manière frappante, la plupart des protéines microbiennes forment des structures multimeriques caractéristiques des amyloïdes de façon autonome. De plus, les feuillets β semblent s'aligner avec les feuillets β des protéines amyloïdes humaines, par exemple l' α -synucléine. Cela implique que les

petits amyloïdes microbiens peuvent agir comme des semences pour l'agrégation ultérieure des amyloïdes humains.

La plausibilité des prédictions structurales d'AlphaFold3 a été vérifiée par une simulation de dynamique moléculaire mélangeant l' α -synucléine et petites protéines candidates dérivées du microbiome. L'assemblage est resté étroitement lié tout au long de la simulation, indiquant que la prédiction d'AlphaFold3 de structures co-agrégées d'amyloïdes humains et microbiens reflète des états fortement métastables. Plus précisément, la stabilisation thermodynamique de l'amyloïde humain en présence de la petite protéine amyloïdogène microbienne est un fort indicateur que la protéine bactérienne peut ensemencher la formation d'amyloïdes humains. Dans la proposition actuelle, nous visons à valider expérimentalement ces prédictions *in silico*.

Plan d'expériences

Sur la base des prédictions d'amyloïdogénicité et de la modélisation des structures 3D (propension à former des feuillets β et à s'aligner avec les feuillets β des amyloïdes humains), 10 séquences candidates ont été identifiées pour des tests expérimentaux *in vitro* de l'amyloïdogénicité et du potentiel à agir comme des semences pour l'agrégation des amyloïdes humains. En plus, deux séquences ont été sélectionnées comme témoins négatifs et positifs. Les propriétés amyloïdogènes seront évaluées expérimentalement sur des protéines synthétiques et exprimées par (i) L'évaluation de leur propension à former des amyloïdes en évaluant la cinétique d'agrégation dans des conditions physiologiquement représentatives. La cinétique sera évaluée en utilisant des techniques couramment utilisées telles que la fluorescence de la thioflavine T. La structure des agrégats formés sera également évaluée par microscopie électronique à transmission (échelle macromoléculaire) et par spectroscopie (structure secondaire). (ii) L'évaluation de leur propension à ensemencher (c'est-à-dire déclencher l'agrégation) avec des protéines hôtes médicalement importantes : α -synucléine, A β , et tau. Le même ensemble de techniques sera utilisé. (iii) L'évaluation de leurs effets physiologiques (toxicité et réponse inflammatoire) à l'aide d'expériences *in vitro* utilisant des neurones et des microglies primaires.

Outre les tests sur des petites protéines synthétisées chimiquement qui peuvent ne pas présenter les conformations tridimensionnelles correctes ou peuvent manquer de modifications critiques, nous réaliserons également une expression génique basée sur des microorganismes ainsi que des méthodes sans cellules. Les petites protéines candidats seront clonées dans un vecteur de clonage standard et utilisées pour transformer *Escherichia coli*. Les cellules transformées seront testées pour la formation d'amyloïdes en particulier par microscopie après coloration à la thioflavine T. De plus, l'expression génique sans cellules sera réalisée en présence de la machinerie de transcription et de traduction de *E. coli*. Les petites protéines purifiées seront testées par les mêmes méthodologies utilisées sur les petites protéines synthétiques.

Perspectives et impact clinique

Savoir si les petites protéines dérivées du microbiome peuvent ensemencher des amyloïdes liés à la neurodégénérescence est d'une importance capitale car cela pourrait révéler des liens causaux entre des microorganismes spécifiques et la pathogenèse de maladies

neurodégénératives. Ainsi, les petits amyloïdes dérivés du microbiome présentent un potentiel significatif en tant que nouveaux biomarqueurs pour le pronostic et le diagnostic des maladies, ainsi que des cibles potentielles ou des guides pour des interventions thérapeutiques précoces. Avant que de telles applications puissent être développées, une vérification moléculaire détaillée et une compréhension mécanistique sont nécessaires pour déterminer comment et dans quelle mesure les petites protéines microbiennes déclenchent le mauvais repliement et l'agrégation des amyloïdes humains critiques.

Étude du rôle du transfert des mitochondries et lysosomes par les tunneling nanotubes dans les maladies neurodégénératives

Les agrégats pathologiques de protéines, tels que l' α -synucléine et la protéine tau, sont une caractéristique observée dans plusieurs maladies neurodégénératives, y compris la maladie d'Alzheimer (AD), la maladie de Parkinson (PD) et la démence frontotemporale (FTD). L'agrégation pathologique de ces protéines perturbe la fonction neuronale par divers mécanismes, conduisant in fine au stress cellulaire et à la mort neuronale. Les microglies, les cellules immunitaires innées du cerveau, jouent un rôle important dans le maintien de la santé et de l'intégrité neuronale en médiant notamment l'élagage synaptique, le nettoyage des débris, ainsi qu'en libérant des facteurs neurotrophiques. Dans les maladies neurodégénératives, les agrégats pathologiques de protéines affectent l'équilibre homéostatique des cellules microgliales, altérant ainsi la fonction et l'intégrité neuronales, tout en créant un environnement neuroinflammatoire.

Un nouveau mécanisme d'interaction microglie-neurone, médié par des connexions intercellulaires directes, à savoir via des « tunneling nanotubes » (TNTs), a récemment été décrit entre ces types cellulaires (Scheiblich et al., 2024). Les TNTs sont de fines protrusions cellulaires composées d'actine et de tubuline, qui forment un pont entre les cellules et facilitent le transfert de protéines, de mitochondries, de lysosomes et de vésicules intracellulaires. Des données préliminaires utilisant un modèle cellulaire murin suggèrent que les microglies peuvent former des TNTs avec les neurones et les débarrasser des agrégats pathologiques de protéines composés de tau hyperphosphorylée ou d' α -synucléine, favorisant ainsi la dégradation de ces protéines (Scheiblich et al., 2024). De plus, il a été démontré que les microglies partagent via les TNTs leurs mitochondries saines avec les neurones affectés, réduisant ainsi le stress oxydatif et restaurant la santé neuronale. L'échec d'un tel mécanisme neuroprotecteur pourrait, à son tour, être la cause de la neurodégénérescence. Bien que les TNTs puissent promouvoir la santé et la survie des cellules, ils améliorent également la fonction globale de la population microgliale et neuronale, aidant à atténuer l'inflammation et la dysfonction neuronale.

Évaluer la formation des TNTs et leur activité de transfert de divers organites et protéines agrégées pourrait donc significativement améliorer notre compréhension des mécanismes neuropathologiques impliqués entre les neurones et les microglies dans le contexte de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. De plus, exploiter le potentiel des TNTs pour promouvoir le transfert mitochondrial ou lysosomal pourrait ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces maladies neurodégénératives.

Dans notre laboratoire, nous possédons actuellement de nombreuses lignées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) avec divers polymorphismes de gènes identifiés par des études d'association génomique (GWAS) qui pourraient moduler le risque de développer la maladie d'Alzheimer ou Parkinson, y compris des mutations dans les gènes APOE, TREM2 et CD33. Pour ce projet, nous visons à modifier génétiquement certaines de ces lignées iPSC afin que celles-ci aient leurs mitochondries et leurs lysosomes expriment un marqueur fluorescent, en utilisant la technologie CRISPR-Cas. Cette technique nous permettra d'obtenir des mitochondries et des lysosomes marqués de manière stable dans les lignées de iPSC, qui seront ensuite différenciées en neurones corticaux et en microglies. Nous visons à étudier la formation de TNTs entre ces types cellulaires en les cultivant dans un système de coculture. En caractérisant la formation de TNT entre les neurones et les microglies, notre premier objectif est de comprendre et de caractériser la dynamique de la formation des TNTs. De plus, en suivant les mitochondries et lysosomes fluorescents grâce à une technique de microscopie à haute résolution, cela nous permettra de comprendre divers paramètres tels que la cinétique du transport et la direction du transfert de ces organites entre neurones et microglies, ainsi que permettre de comprendre les processus moléculaires et cellulaires étant impliqués dans les cellules donneuses et réceptrices. L'étude du transfert de ces organites via les TNTs dans diverses lignées contrôles et dérivées de patients AD et PD nous aidera également à définir les mécanismes spécifiques de ces maladies, pouvant ensuite être exploités pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. Enfin, l'utilisation de molécules modulant la formation de TNTs et régulant le transfert des organites pourrait également servir de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de ces troubles neurodégénératifs.

Notre laboratoire a acquis une expertise significative dans la culture de iPSC et la technologie CRISPR-Cas, nous permettant de réaliser à bien ce projet. De plus, notre laboratoire a une expertise dans la formation et l'analyse des TNTs dans divers types cellulaires, y compris les neurones et les microglies dérivés de iPSC, les lignées cellulaires immortalisées et les lignées primaires de souris. Notre collaborateur, le Dr David Bouvier (LNS/LCSB), fournira des échantillons de cerveau humain post-mortem comme preuve de concept pour étudier la présence potentielle de TNTs dans les tissus humains, que nous corrélons avec les données obtenues avec nos lignées cellulaires de patients. L'expertise du Dr Anaïs Carpentier (LNS) en microscopie électronique nous permettra de réaliser de la microscopie électronique à balayage (SEM) et de la microscopie électronique en transmission (TEM) sur les TNTs des microglies-neurones dérivés de iPSC, permettant une cartographie détaillée de la conformation structurale des TNTs ainsi que de fournir des informations sur le transfert mitochondrial et lysosomal à travers ces structures.

En résumé, le financement de ce projet permettra d'améliorer notre compréhension du rôle de la formation des TNTs entre les neurones et les microglies, et en particulier du transfert fonctionnel des mitochondries et des lysosomes via ces structures dans le contexte de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Comprendre le rôle du transfert mitochondrial et lysosomal via les TNTs sera ensuite exploité pour développer des diagnostics ainsi que de nouvelles voies thérapeutiques pour ces troubles neurodégénératifs. Enfin, nous pensons que les résultats de ce projet serviront de catalyseur pour d'autres demandes de subventions et propositions de projets sur les TNTs à l'avenir.