

Caractérisation d'un modèle de poisson-zèbre pour l'étude des encéphalopathies développementales et épileptiques dues aux mutations du gène *KCNB1*

25/10/2023

Introduction

Les encéphalopathies développementales et épileptiques (EDE) sont des troubles dévastateurs du neurodéveloppement, incluant des déficits moteurs, comportementaux et psychiatriques associés à une épilepsie sévère et pharmaco-résistante, diagnostiqués pendant la petite enfance. La liste des gènes associés aux EDE ne cesse de s'allonger, mais le développement de traitements moléculaires ciblés accuse un retard considérable. Des mutations du gène *KCNB1*, codant pour un canal potassique Kv2.1 et participant au repos neuronal du cerveau en condition physiologique, ont été rapportés chez des patients atteints d'EDE. Ces variations dans la séquence d'ADN de *KCNB1* conduisent à une perte de fonction qui se traduit notamment par un dysfonctionnement et une perte d'efficacité du canal Kv2.1 (ou *KCNB1*) à mettre les neurones au repos. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés notamment dans des modèles *in vitro* (cultures cellulaires), notre compréhension sur le rôle de *KCNB1* dans les EDE reste encore à élucider dans le contexte d'un modèle *in vivo* (modèle animal).

Objectifs

Notre travail est de fournir de nouveaux éléments clés et de mettre en lumière des mécanismes pathologiques dus à un dysfonctionnement du canal Kv2.1 (ou *KCNB1*). Le projet de recherche se concentre sur un modèle génétique de poisson-zèbre par inactivation du gène *kcnb1* à l'aide de techniques génétiques permettant la récapitulation de la perte de fonction du canal observée chez les patients atteints d'EDE. Le modèle est étudié entre 0 et 6 jours post-fécondation (jpf) afin d'évaluer la période d'apparition et de développement de la maladie chez les embryons et larves de poisson-zèbre. Ce projet a pour but de répondre à trois objectifs principaux : (1) mimer les principaux symptômes observés chez les patients à différentes échelles (anatomique, morphologique, locomotrice) afin de déterminer la pertinence de ce modèle pour l'étude des EDE, (2) déterminer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à ce gène en évaluant son rôle dans le système nerveux central par une meilleure compréhension de son implication dans les fonctions neuronales et en caractérisant un éventuel phénotype épileptique et (3) identifier une stratégie thérapeutique efficace chez le poisson-zèbre, pour protéger contre l'apparition des premiers symptômes ou pour restaurer ceux déjà existants, qui serait applicable aux patients.

Résultats

Les résultats obtenus indiquent que le modèle génétique de poissons-zèbre présente des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints d'EDE. En effet, l'inactivation partielle (*kcnb1+/-*) ou complète (*kcnb1-/-*) de *kcnb1* dans l'organisme des poissons-zèbres a révélé à la fois un comportement de nage incontrôlé et une hyperexcitabilité des circuits neuronaux reflétant un phénotype épileptique. Les premières molécules testées ont fourni une protection contre certaines dysrégulations identifiées. Les résultats obtenus seront présentés prochainement dans un article actuellement en préparation (Robichon et al. *In preparation*).

Ainsi, les résultats ont révélé un taux de survie des modèles mutants (*kcnb1*^{+/-} et *kcnb1*^{-/-}) similaire à la condition contrôle et n'ont pas montré de changements majeurs dans les paramètres morphologiques clés. L'inactivation partielle ou complète de *kcnb1* conduit à une diminution de l'activité prémotrice, consistant en des contractions répétitives des muscles de la queue, au cours du premier jour post-fécondation (jpf) par rapport à la condition contrôle et reflétant une perturbation de la fonction neuronale. Au 2^{ème} jpf, les larves contrôles développent des réponses de fuite suite à une stimulation mécanique et caractérisées par des trajectoires de nage droites et contrôlées. A ce stade, la trajectoire des modèles mutants est caractérisée par des nages circulaires, cohérentes avec le phénotype épileptique. L'activité locomotrice spontanée a ensuite été étudiée entre 3 et 6 jpf révélant une hyperactivité locomotrice à la fois durant des périodes de luminosité et d'obscurité chez les larves *kcnb1*^{-/-}. La réponse locomotrice à une molécule pro-convulsivante est significativement augmentée chez les poissons mutants et ces résultats sont corrélés à une hyperactivité neuronale par évaluation de marqueurs spécifiques dans le cerveau ainsi que par des changements électrophysiologiques plus importants enregistrés dans le cerveau des larves des lignées mutantes. En revanche, l'inactivation de *kcnb1* n'a pas induit de changements dans l'organisation structurelle des fibres musculaires de la queue des poissons ni dans l'organisation des circuits neuronaux. De plus, le criblage des premières molécules favorisant l'augmentation du GABA disponible dans les circuits neuronaux a révélé un effet protecteur contre l'hyperactivité locomotrice induite par une molécule pro-convulsivante. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de mécanismes de perte de fonction responsables du phénotype d'encéphalopathie KCNB1, affectant les fonctions électriques des neurones.

Futures expériences

Le modèle de poisson-zèbre perte de fonction de *kcnb1* a permis d'obtenir des résultats encourageants que nous souhaitons confirmer notamment par l'identification précise des sous-types neuronaux affectés (inhibiteurs et/ou excitateurs). Ces nouveaux résultats permettront d'identifier et de cribler quelques molécules candidates à la fois dans les modèles animaux et cellulaires. Les cultures cellulaires et le modèle du poisson-zèbre, en raison de sa perméabilité, sont de bons candidats pour le criblage de molécules. Nous prévoyons de tester des molécules candidates telles que des activateurs de la synthèse du GABA et des inhibiteurs de la libération du glutamate en fonction des prochains résultats obtenus et qui détermineront les voies de signalisation et/ou des fonctions neuronales spécifiquement impactées par l'inactivation de *kcnb1*.

Conclusion

Cette étude démontre que le modèle perte de fonction de *kcnb1* chez le poisson-zèbre est un modèle précieux pour récapituler certaines caractéristiques phénotypiques précoces de l'encéphalopathie KCNB1, associant une déficience comportementale et locomotrice précoce, une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie et des déficiences de la fonction neuronale dans le cerveau en développement des embryons et des larves. Ainsi, ces résultats soulignent l'importance de KCNB1 dans les voies de signalisation neuronale du développement et soutiennent la pertinence de la perte de fonction de KCNB1 en tant que cause génétique des troubles EDE apparentés. Ce modèle pourrait être utilisé pour identifier des stratégies thérapeutiques efficaces pour améliorer le pronostic à long terme des patients atteints d'encéphalopathie KCNB1.

CV scientifique (Lauralee ROBICHON, Doctorante en 3ème année)

COMMUNICATIONS ORALES :

- "Zebrafish seminar" de l'Institut IMAGINE, Paris, France, December 2021. "Zebrafish model for the study of *KCNB1* in developmental and epileptic encephalopathies". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 8th young researchers of IMAGINE institute congress, Paris, France, May 2022. "Characterization of a zebrafish model for the study of *KCNB1* in developmental and epileptic encephalopathies". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 3rd Workshop on rare and complex epilepsies, Rome, Italy, December 2022. "Study of developmental and epileptic encephalopathies in a *kcnb1* knock-out zebrafish model". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

FLASH TALKS :

- 7th young researchers of IMAGINE institute congress, Paris, France, May 2021. "Zebrafish models: characterization of *KCNB1* and *KCNT1* zebrafish models in the context of developmental and epileptic encephalopathies". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 35th European College of Neuropsychopharmacology congress, Vienna, Austria, October 2022. "Behavioral and physiological analysis in a *kcnb1* knock-out zebrafish model of epilepsy and neurodevelopmental disorders". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

POSTERS :

- Scientific days of ED3C, Paris, France, April 2021. "Development of zebrafish models for the study of developmental and epileptic encephalopathies due to mutations in *KCNT1* and *KCNB1* genes". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 7th young researchers of IMAGINE institute congress, Paris, France, May 2021. "Zebrafish models: characterization of *KCNB1* and *KCNT1* zebrafish models in the context of developmental and epileptic encephalopathies". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 34th European College of Neuropsychopharmacology congress, Lisbon, Portugal, October 2021. "Zebrafish model: study of *KCNB1* in developmental and epileptic encephalopathies". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- Scientific days of ED3C, Paris, France, April 2021. "Development of zebrafish models for the study of developmental and epileptic encephalopathies due to mutations in *KCNT1* and *KCNB1* genes". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- Forum of European Neuroscience congress (FENS), Paris, France, July 2022. "Phenotypic characterization of a zebrafish model for the study of *KCNB1* in developmental and epileptic encephalopathies". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 35th European College of Neuropsychopharmacology congress, Vienna, Austria, October 2022. "Behavioral and physiological analysis in a *kcnb1* knock-out zebrafish model of epilepsy and neurodevelopmental disorders". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- Scientific days of ED3C, Paris, France, April 2021. "Development of zebrafish models for the study of developmental and epileptic encephalopathies due to mutations in *KCNT1* and *KCNB1* genes". Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- 35th International Epilepsy Congress (IEC), Dublin, Ireland, September 2023. "Phenotypic characterization of a *kcnb1* knock-out zebrafish model in the context of epileptic and neurodevelopmental disorders ». Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

- First Fench Zebrafish meeting (FZM), Montpellier, France, October 2023. "Characterization of a *kcnb1* knock-out zebrafish as a genetic model for neurodevelopmental and epileptic disorders ». Lauralee Robichon, Claire Bar, Lisa Lehmann, Anca Marian, Solène Renault, Sorana Ciura, Edor Kabashi, Rima Nabbout

PUBLICATIONS MAJEURES :

Duriez, P., **ROBICHON, L.**, Dardennes, R., Grouselle, D., Gorwood, P., Tolle, V., Viltart, O. (August 2020). Unexpected association of desacyl-ghrelin with physical activity and chronic food restriction: a translational study on anorexia nervosa. *Journal of Clinical Medicine* ; 9, 2782; DOI :10.3390/jcm9092782.

ROBICHON, L., Bar, C., Lehmann, L., Marian, A., Renault, S., Ciura, S., Kabashi, E., Nabbout, R. Phenotypic characterization of a *kcnb1* knock-out zebrafish as a genetic model for neurodevelopmental and epileptic disorders. *In preparation*.

VULGARISATION SCIENTIFIQUE :

- Interview Journée internationale de l'épilepsie, 8 février 2021 :
<https://www.youtube.com/watch?v=3pt1VlaMTbc>
<https://www.institutimagine.org/fr/epilepsies-rares-ou-en-est-1012>
- Interview écrire pour le journal interne de l'Hôpital Necker, Avril 2021
- Interview pour l'Association KCNB1 France, 11 Février 2023 :
<https://emea01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fyoutu.be%2FqmhIBjEIO0w&data=05%7C01%7C%7C333a880d848b4b8c803608db0b705fa1%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C638116349495753412%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWlloiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLCJBTiI6Ikl1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sdata=Ozw3HtShcLKqcFARGg%2FbrkmlIYotdYdJDQVgLf7CPwY%3D&reserved=0>
- 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} Journées Internationales KCNB1 organisées par l'Association KCNB1 France – Hôpital Necker, Institut IMAGINE, Paris, France, Mars 2021 à 2023
- Encadrement de deux stagiaires de collègue

PRIX – AWARDS – FINANCEMENTS :

- Septembre 2019: Travel award from the 32nd European college of Neuropsychopharmacology congress, Copenhagen, Denmark.
- Octobre 2020: Prix de « Thèse sur une Maladie Rare » par la Fondation de Recherche Médicale (dossier : FRM PLP202010012460).
- Mai 2021: 1er prix pour une présentation de poster au 7^{ème} congrès des Jeunes chercheurs de l'Institut IMAGINE, Paris, France.
- Juin 2023: Financement d'une 4^{ème} année de thèse "4th year PhD program of Imagine Institute"

VOLONTARIAT :

Vice-secrétaire de l'association des Jeunes Chercheurs de l'Institut IMAGINE 2022-2023 (association YR2I)