



Régulation du Transport et de l'Expression de MECP2: Des pistes innovantes pour le syndrome de Rett

Nicolas Panayotis

SPPIN, Equipe "Biologie Moléculaire du Transport neuronal"
CNRS | Université Paris Cité



Qui suis-je ? Où est mon labo ?

Physiopathologie du syndrome de Rett



Marseille
Medical
Genetics

Transport neuronal / importines



WEIZMANN
INSTITUTE
OF SCIENCE

Importines et TND/Autismes (Rett, MDS..)

SPPIN

SAINTS-PERES
Paris Institute for
the Neurosciences

Ph.D
MMG
(Inserm/
AMU)



Dec
2011

Postdoc
Weizmann
(Fainzilber lab)



2017

Research Associate
Weizmann
(Fainzilber lab)



Selected by
the SPPIN

Late
2021

Dec
2022

Lab opening
(SPPIN, UP Cité)



May
2023

2024

2025

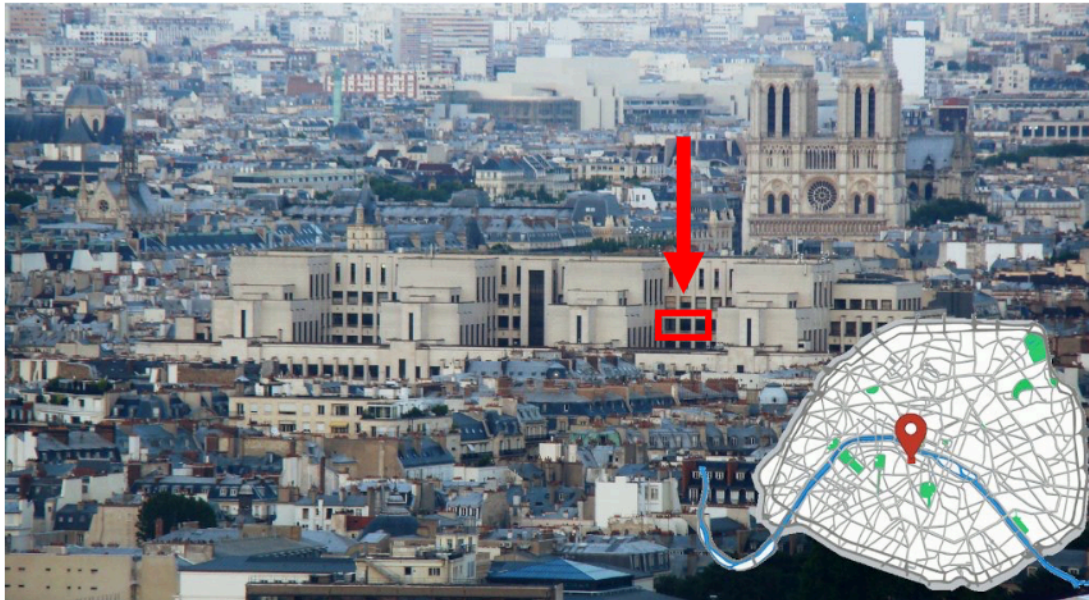
2026

2027

2028

2029

2030



Ici on connait tous le couplable: *MECP2* !

© 1999 Nature America Inc. • <http://genetics.nature.com>

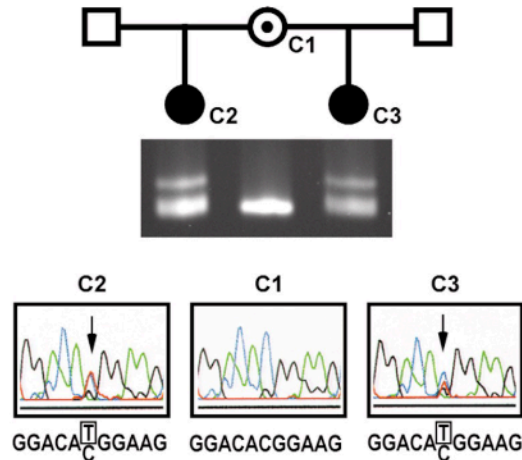
letter

Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2

Ruthie E. Amir¹, Ignatia B. Van den Veyver^{2,3}, Mimi Wan⁵, Charles Q. Tran³, Uta Francke^{5,6}
& Huda Y. Zoghbi^{1,2,4}

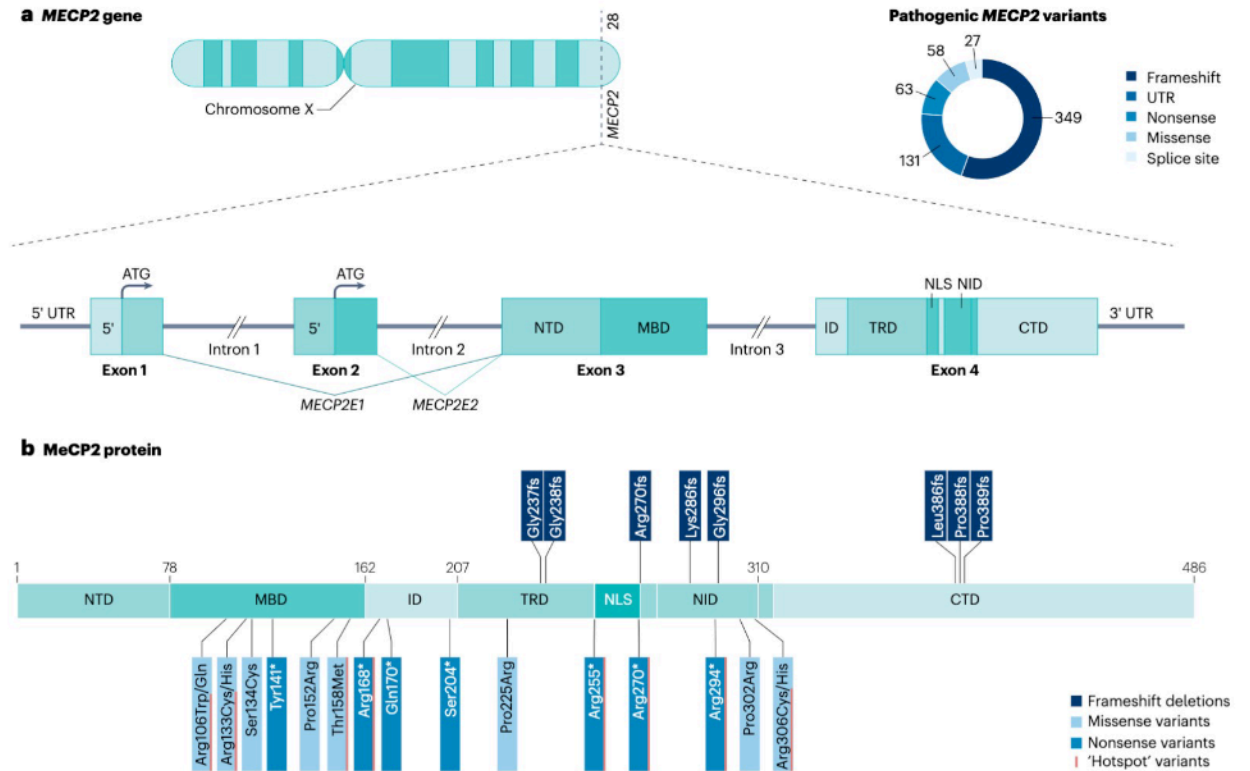


Professor Huda Zoghbi
Baylor College of Medicine, USA



Amir et al, 1999 *Nature* 1999 23(2):185-8.
doi: [10.1038/13810](https://doi.org/10.1038/13810)

Gène *MECP2* humain, protéine, and mutations fréquentes



Gold et al, 2024 *Nat Rev Dis Primers* 10, 84
doi: [10.1038/s41572-024-00568-0](https://doi.org/10.1038/s41572-024-00568-0)

Localisation & fréquence des mutations de *MECP2*

La sévérité de la pathologie est liée au domaine affecté par la mutation.

La liaison de MeCP2 à l'ADN est nécessaire à sa fonction.

Les mutations situées dans le MBD (domaine de liaison aux méthyles), comme T158M, sont plus délétères.

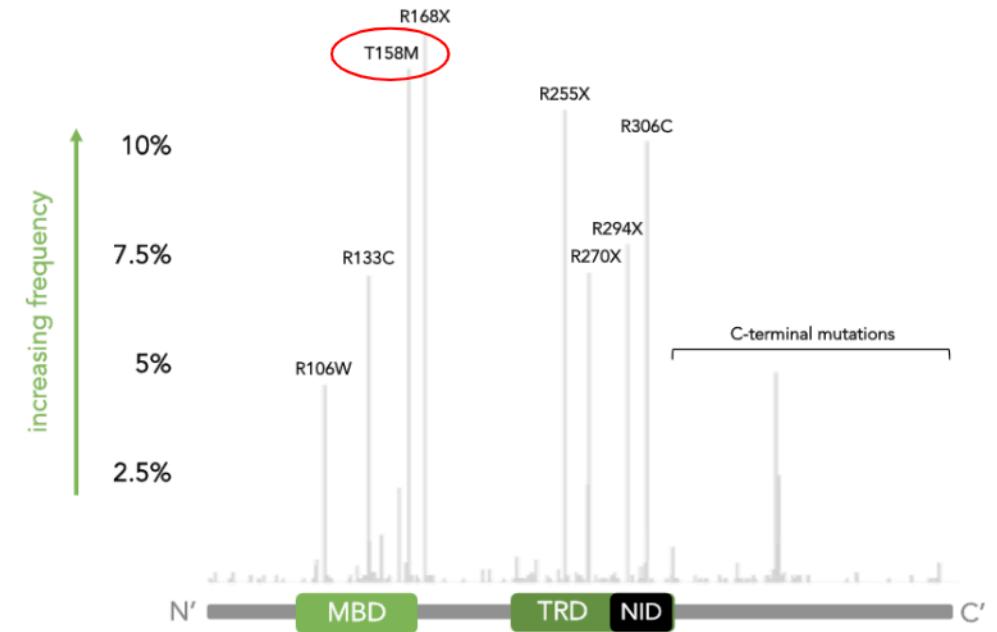
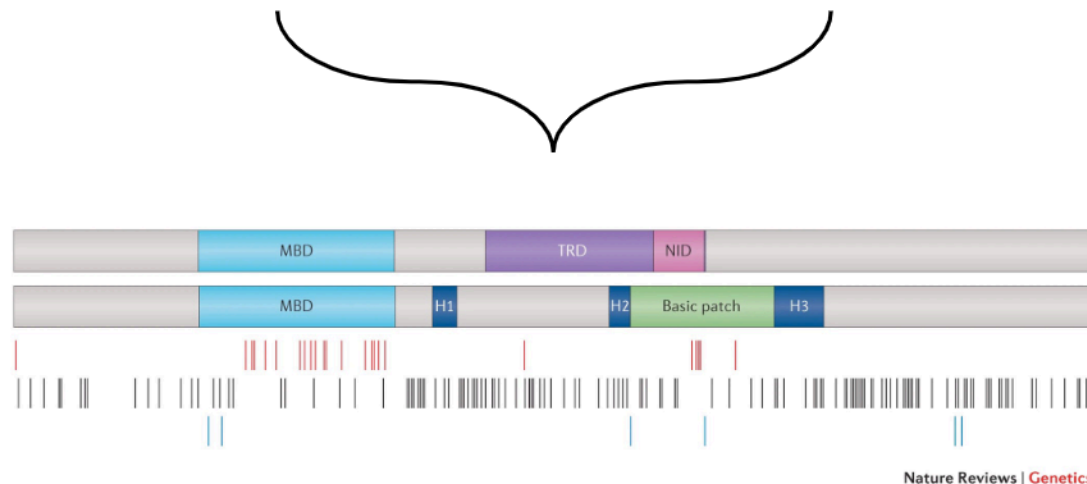


Figure 3 Common *MECP2* mutations in Rett syndrome. Frequency map of *MECP2* mutations identified in girls with RTT from the NIH Natural History Study of Rett Syndrome and Related Disorders. Mutation frequency is depicted on the y-axis while the start of the mutation along the protein sequence is indicated on the x-axis. A schematic of the MeCP2 protein domains is provided for reference. The 8 common point mutations and set of C-terminal mutations are indicated.

Bienvenu & Chelly, 2006 *Nat Rev Genet* 7(6):415-26; doi: [10.1038/nrg1878](https://doi.org/10.1038/nrg1878)

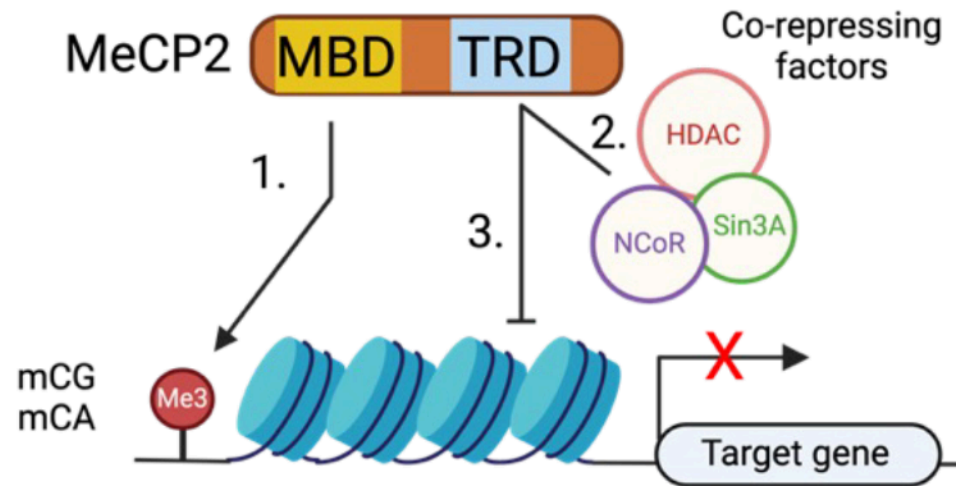
Cuddapah et al, 2014 *J Med Genet* 51(3):152-8; doi: [10.1136/jmedgenet-2013-102113](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102113)

Lyst & Bird, 2015 *Nat Rev Genet* 16(5):261-75; doi: [10.1038/nrg3897](https://doi.org/10.1038/nrg3897)

Collins & Neul, 2022 *Neuropsychiatr Dis Treat* 29:18:2813-2835.
doi: [10.2147/NDT.S371483](https://doi.org/10.2147/NDT.S371483)

Ehrhart et al, 2021 *Sci Data* 15;8(1):10;
doi: [10.1038/s41597-020-00794-7](https://doi.org/10.1038/s41597-020-00794-7)

MeCP2: un acteur central dans la répression de l'expression des gènes

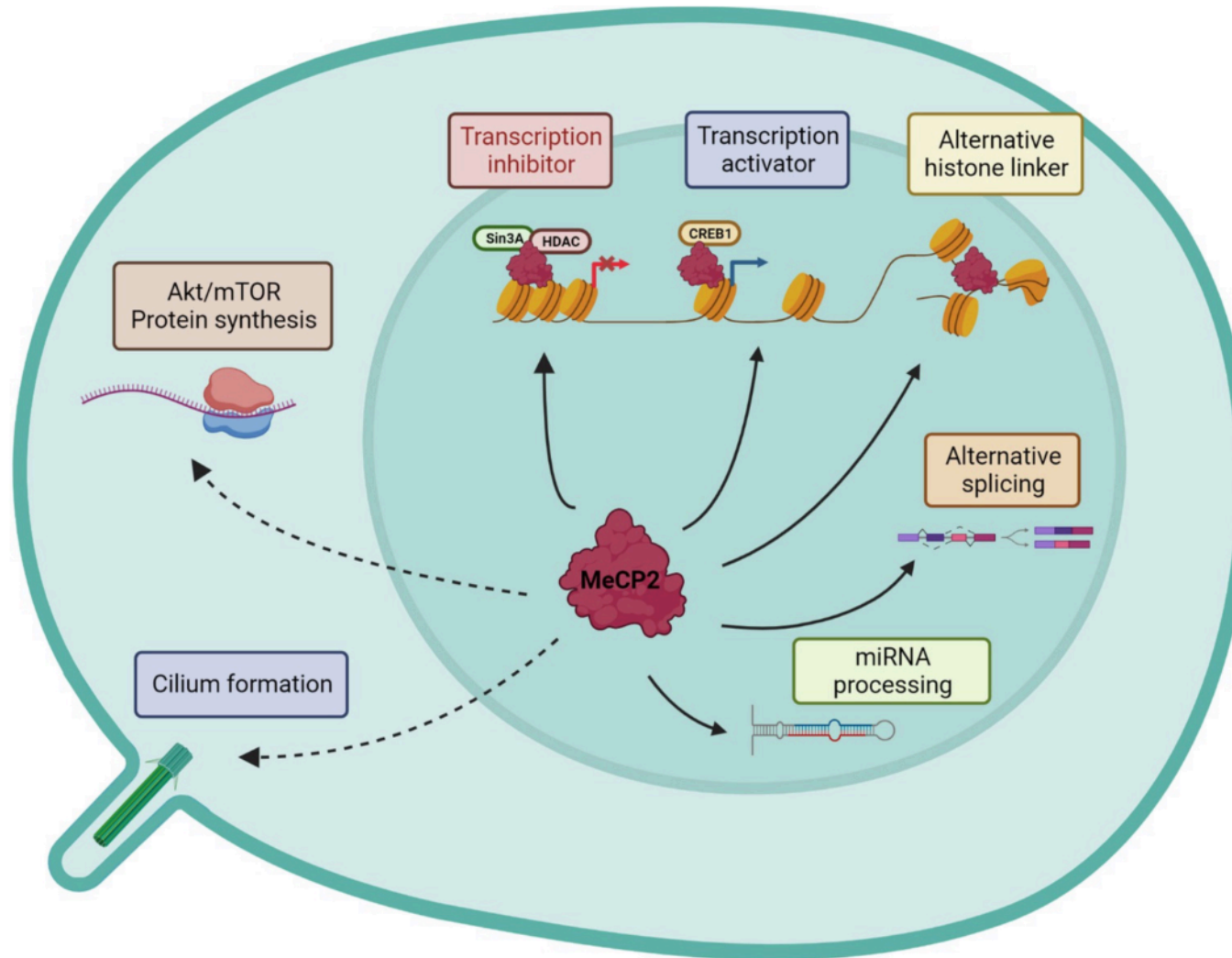


MBD: Methyl-binding domain
TRD: Transcription Repression Domain



Professor Sir Adrian Bird
University of Edinburgh, United Kingdom

Mais il s'aventure au-delà de ça...



Les souris modèles:

Absence totale de MeCP2 vs mutations spécifiques ?

Table 1 Mouse Models of *MECP2* Mutation and Duplication

Line	Mutation	Description	Tags	Reference(s)
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Bird}	Knockout	Cre-mediated excision of <i>Mecp2</i> exons 3 and 4	None	[140,219]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Jae}	Knockout	Cre-mediated excision of <i>Mecp2</i> exon 3	None	[139]
<i>Mecp2</i> ^{tm4.1Joz}	R106W	Introduction of exon 3 containing R106W mutation and C-terminal Tavi tag	Tavi (C-terminal)	[157]
Tg(<i>MECP2</i> *R111G/EGFP)1Hzo	R111G	Introduction of human <i>MECP2</i> gene with R111G mutation onto an autosome	EGFP (C-terminal)	[155]
<i>Mecp2</i> ^{tm6.1Bird}	R133C	Introduction of exon 4 containing R133C mutation and C-terminal EGFP tag	EGFP (C-terminal)	[133]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Vnar}	A140V	Introduction of exon 4 containing A140V mutation	None	[156]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Joz}	T158A	Introduction of exon 4 containing T158A mutation	None	[158]
<i>Mecp2</i> ^{tm4.1Bird}	T158M	Introduction of exon 4 containing T158M mutation and C-terminal EGFP tag	EGFP (C-terminal)	[133]
<i>Mecp2</i> ^{tm3.1Joz}	T158M	Introduction of exon 4 containing T158M mutation and C-terminal Tavi tag	Tavi (C-terminal)	[157]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Jtc}	R168X	Introduction of exon 4 containing R168X mutation	None	[220]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Hupp}	R168X	Introduction of exon 4 containing R168X mutation	None	[159]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Irsf}	R255X	Introduction of exon 4 containing R255X mutation	None	[160]

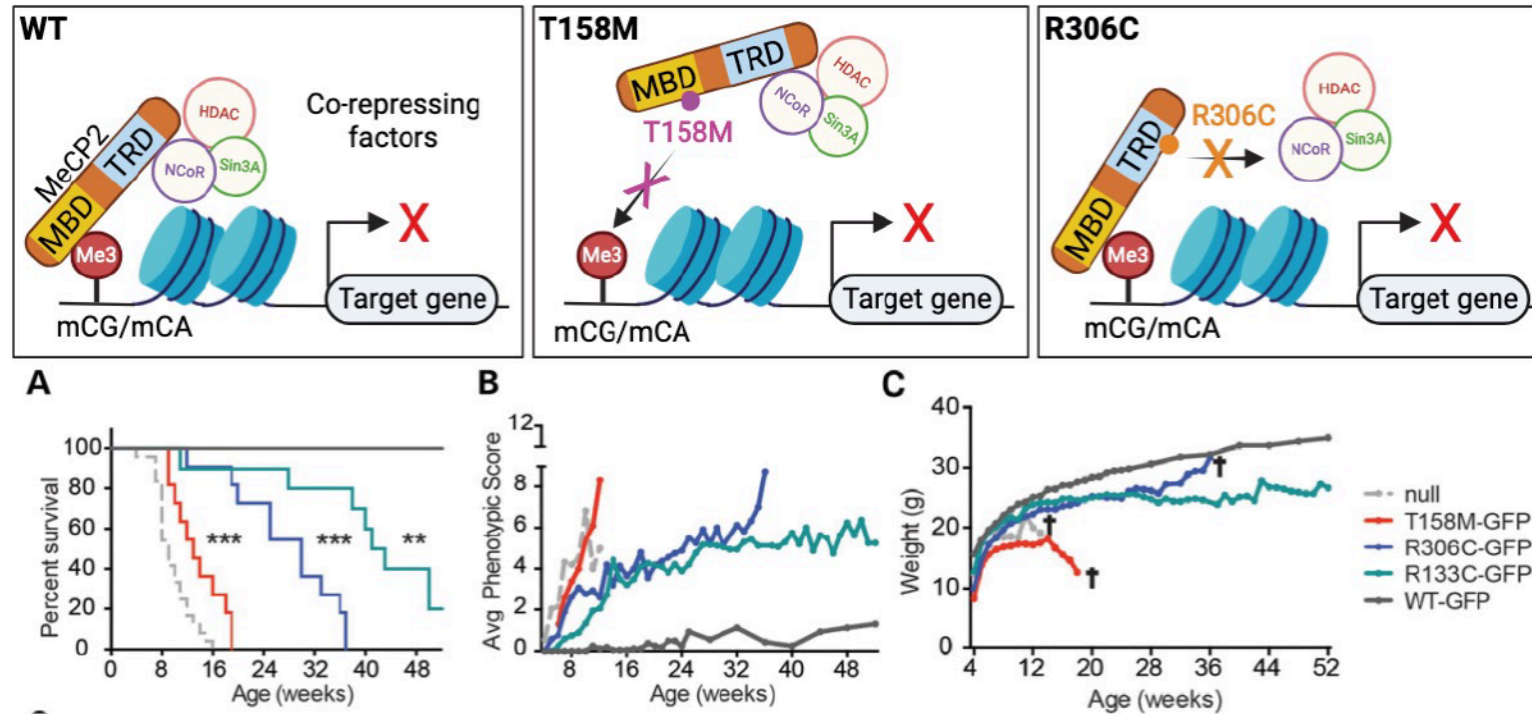
Tg(<i>MECP2</i> *R270X/GFP)1Hzo	R270X	Introduction of exon 4 containing R270X mutation and C-terminal GFP tag	GFP (C-terminal)	[100]
Tg(<i>MECP2</i> *G273X/GFP)1Hzo	G273X	Introduction of exon 4 containing G273X mutation and C-terminal GFP tag	GFP (C-terminal)	[100]
<i>Mecp2</i> ^{R294X}	R294X	CRISPR/Cas9-mediated engineering of the R294X mutation	None	[134]
<i>Mecp2</i> ^{tm2.1Meg}	R306C	Introduction of exon 4 containing R306C mutation	None	[82]
<i>Mecp2</i> ^{tm5.1Bird}	R306C	Introduction of exon 4 containing R306C mutation and C-terminal EGFP tag	EGFP (C-terminal)	[133]
Tg(<i>MECP2</i> *R306C/EGFP)1Hzo	R306C	Introduction of human <i>MECP2</i> gene with R306C mutation and a C-terminal EGFP tag onto an autosome	EGFP (C-terminal)	[155]
<i>Mecp2</i> ^{tm1.1Hzo}	T308X	Introduction of exon 4 containing T308X mutation	None	[221]
<i>Mecp2</i> ^{L386HfsX5}	L386HfsX5	CRISPR/Cas9-mediated engineering of the L386HfsX5 mutation	None	[135]
<i>Mecp2</i> ^{P389X}	P389X	Introduction of exon 4 containing P389X mutation	None	[135]
<i>Mapt</i> ^{tm1.1(Mecp2)Jae}	<i>Mecp2</i> duplication	Introduction of mouse <i>Mecp2</i> cDNA sequence into exon 1 of the tau gene, in-frame with the endogenous tau start codon	None	[174,175]
Tg(<i>MECP2</i>)1Hzo	<i>MECP2</i> duplication	Introduction of human <i>MECP2</i> gene sequence onto an autosome	None	[36]

Collins & Neul, 2022 *Neuropsychiatr Dis Treat* 29:18:2813-2835.

doi: [10.2147/NDT.S371483](https://doi.org/10.2147/NDT.S371483)

Les souris modèles:

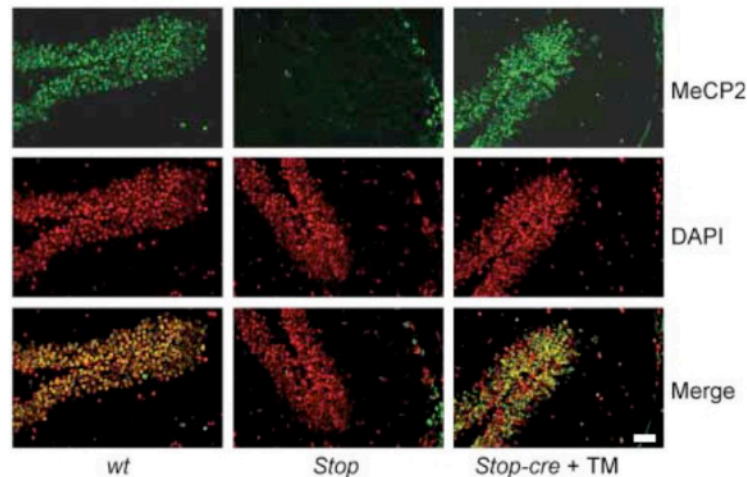
Mutations spécifiques



RTT peut être corrigé chez des souris adultes

Reversal of Neurological Defects in a Mouse Model of Rett Syndrome

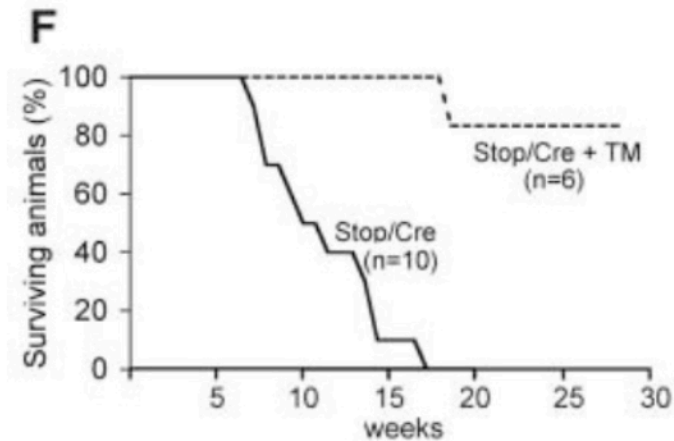
Jacky Guy,¹ Jian Gan,² Jim Selfridge,¹ Stuart Cobb,² Adrian Bird^{1*}



MeCP2-Stop/Cre
(No MeCP2)



MeCP2-Stop/Cre
+ Tamoxifen
(removal of the
Stop cassette = Rescue)



Guy et al, 2007 *Science* 23;315(5815):1143-7.

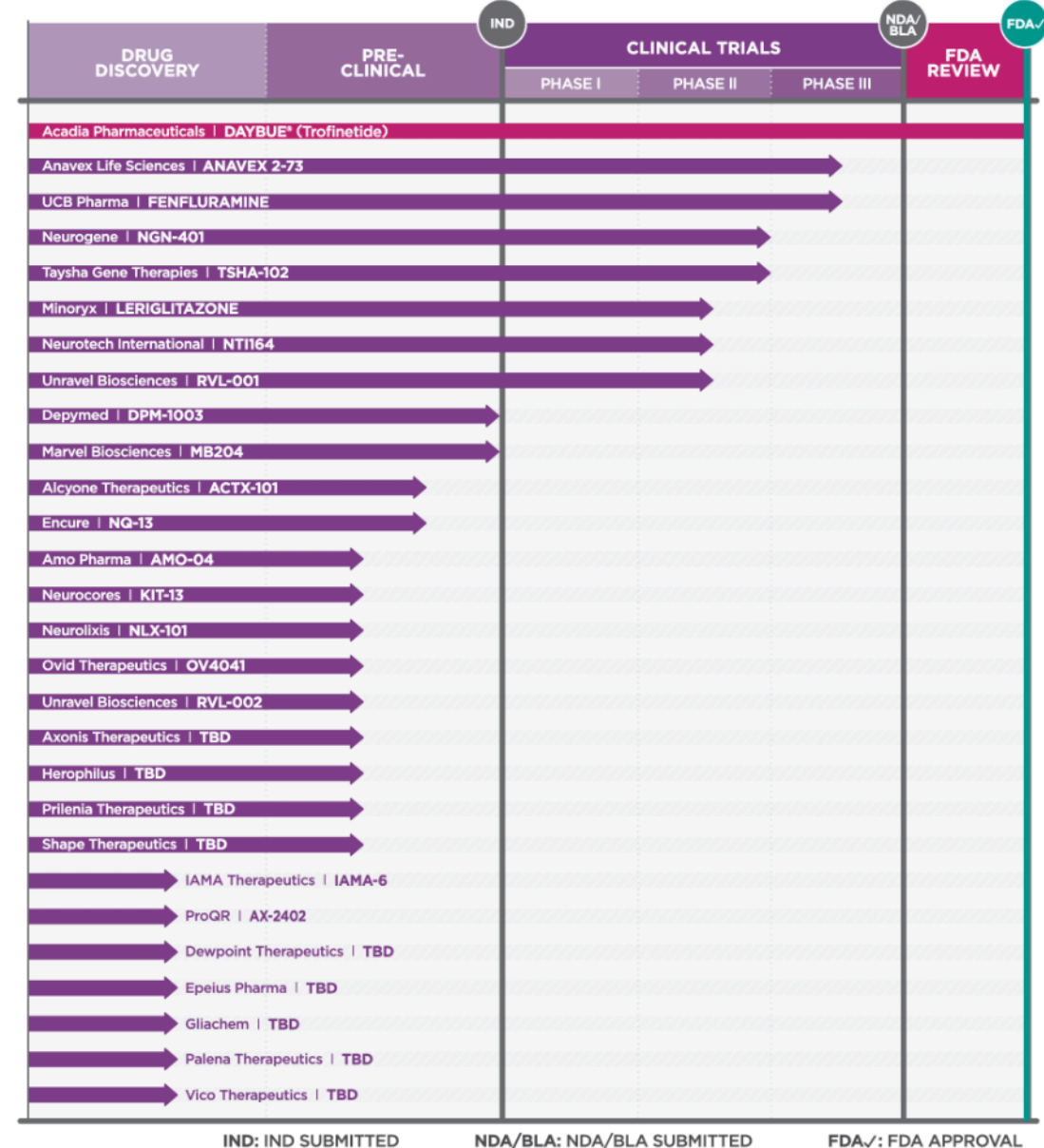
doi: [10.1126/science.1138389](https://doi.org/10.1126/science.1138389)

Des pistes thérapeutiques ?

- Toujours pas de traitement **mais** les efforts pour en trouver un sont considérables pour une maladie qualifiée de “rare”

<https://www.rettssyndrome.org/about-rett-syndrome/pipeline/>

RETT SYNDROME Therapeutic Pipeline



Les pistes thérapeutiques

- Pendant longtemps nous voulions trouver un traitement pharmacologique pour améliorer les symptômes (conséquences)

Clinical issue	Pharmaceutical therapies
Epilepsy	Multiple medications including valproic acid/sodium valproate; oxcarbazepine; lamotrigine; ketogenic diet; vagal nerve stimulator Rescue medications: rectal and intranasal diazepam; intranasal midazolam
GE-reflux	Proton pump inhibitors (preferred); H ₂ -blockers
Stomach emptying	Erythromycin; bethanecol
Constipation	Polyethylene glycol; magnesium sulfate, magnesium citrate; senna
Sleep	Melatonin; trazodone (> 6 years); gabapentin (up to 6 years); clonidine; antihistamines (only short-term as lose efficacy)
Anxiety	SSRIs: escitalopram; sertraline
Self-abuse	Risperidone
Muscle rigidity/hypertonia	Baclofen; botulinum toxin
Drooling	Atropine ophthalmic drops (under tongue); glycopyrrolate
Pain	Ibuprofen; acetaminophen
Prolonged QTc	Beta-blockers; mexiletine
Breathing	None universally effective: buspirone; topiramate
Bone health	Vitamin D (800 IU, at least); calcium; denosumab; bisphosphonates
Menstrual management	Oral contraceptives including progestin-only products; recommend avoiding medroxyprogesterone injection due to adverse bone issues and weight gain
Health maintenance	Multivitamins; complete immunizations

Chapleau et al, 2013 *Curr Clin Pharmacol*. Nov;8(4):358–369.
doi: [10.2174/15748847113086660069](https://doi.org/10.2174/15748847113086660069)

Percy et al, 2024 *CNS Drugs*. 38(11):851-867
doi: [10.1007/s40263-024-01106-y](https://doi.org/10.1007/s40263-024-01106-y)

- Cela a des avantages, mais on ne met pas fin à la pathologie comme ça.
- On la ralentit, on la rend plus supportable...
- Mais les risques d'effets secondaires sont élevés !

- Attention quand même aux confusions, si la Trofinetide a bien reçu un 'FDA approval' ce n'est pas encore un traitement.

Prescribing Information | Patient Information | Acadia Connect | For Healthcare Providers | En Español | Register for updates

Daybue[®] (trofinetide)

About Rett syndrome | About DAYBUE | Taking DAYBUE | Caregiver perspectives | Events | Resources & patient support

Watch our TV commercial >

The only FDA-approved treatment for girls, boys, and adults living with Rett syndrome

Every day, families are seeing more of what's possible for their loved ones.

Maddy, age 21, on DAYBUE

Important Safety Information and Indication

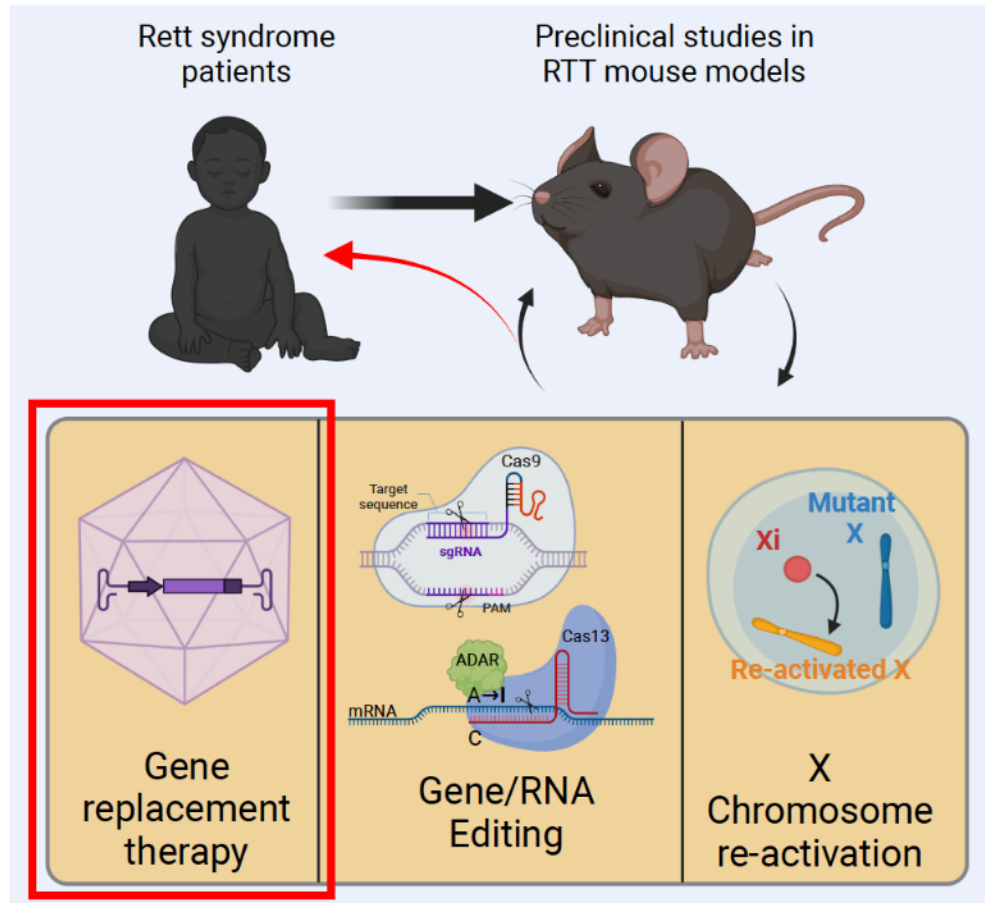
See more +

Table 2. Summary of AEs (safety analysis set)

AEs and preferred term, n (%)	LILAC-2 total (N= 77)
Any AE	72 (93.5)
AEs reported in ≥10% of participants in the LILAC-2 total group	
Diarrhea	41 (53.2)
COVID-19	21 (27.3)
Vomiting	15 (19.5)
Pyrexia	13 (16.9)
Urinary tract infection	13 (16.9)
Seizure	11 (14.3)
Constipation	9 (11.7)
Upper respiratory tract infection	9 (11.7)
Serious AEs	23 (29.9)
AEs leading to drug withdrawal	9 (11.7)
AEs leading to drug withdrawal in ≥2 participants	
Vomiting	2 (2.6)
Fatal AEs	4 (5.2)

Effets secondaires non négligeables/bénéfices limités

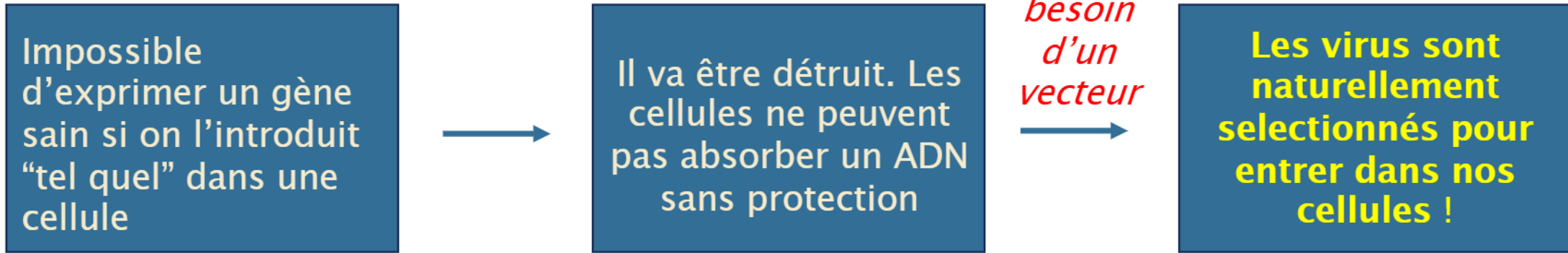
Les thérapies moléculaires sont conçues pour corriger les causes de la pathologie



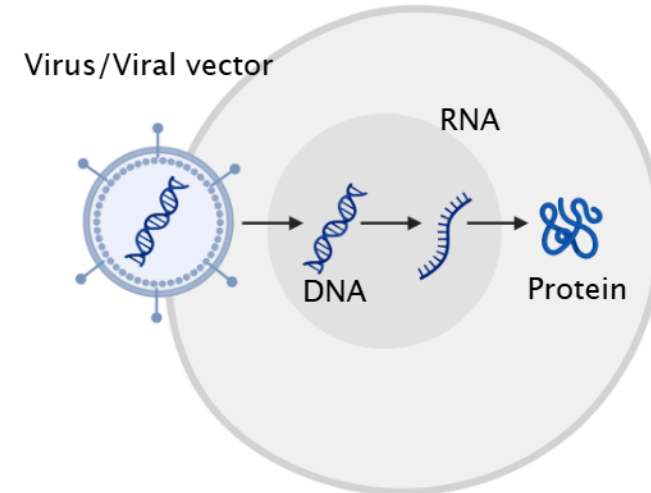
- Remplacement de gène
- Édition d'ADN/ARN (CRISPR)
- Réactivation de l'X « silencieux »

Le remplacement de gène

Comment introduit-on un gène MeCP2 sain ?



Nous détournons cette capacité en supprimant les instructions données par le virus pour se répliquer (nocif), et **on les remplace par le gène/la construction** que l'on souhaite introduire (thérapeutique).



Le remplacement de gène

Plus compliqué que prévu !

- Il faut acheminer le vecteur au bon endroit (cerveau)
- Eviter qu'il affecte les organes peripheriques (foie)
 - Que l'expression du transgene soit optimale

Boucle d'or

et les trois ours

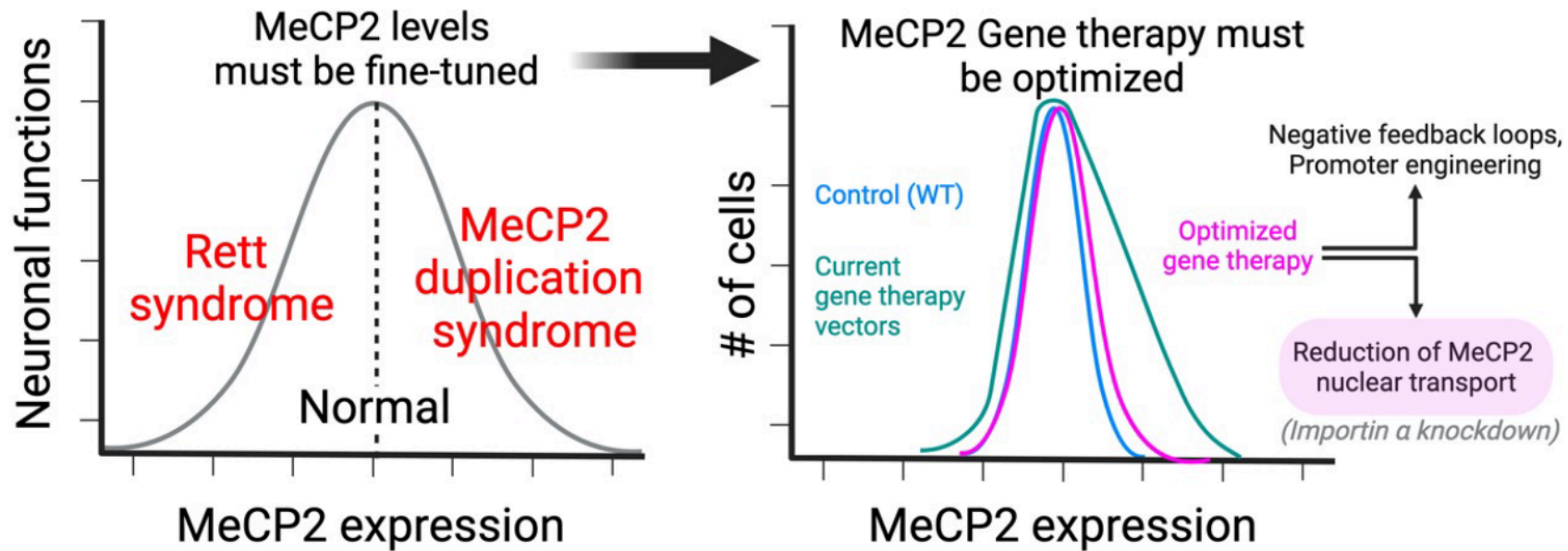


PÈRE CASTOR

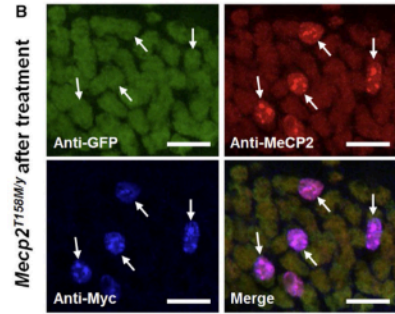
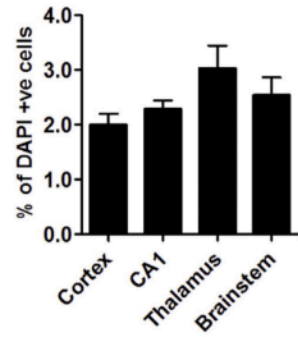
Le point commun
avec MeCP2 ???

*“Boucles d'or goûte les
bols de céréales et se
régale de celui de
l'ourson, **ni trop chaud,
ni trop froid...**”*

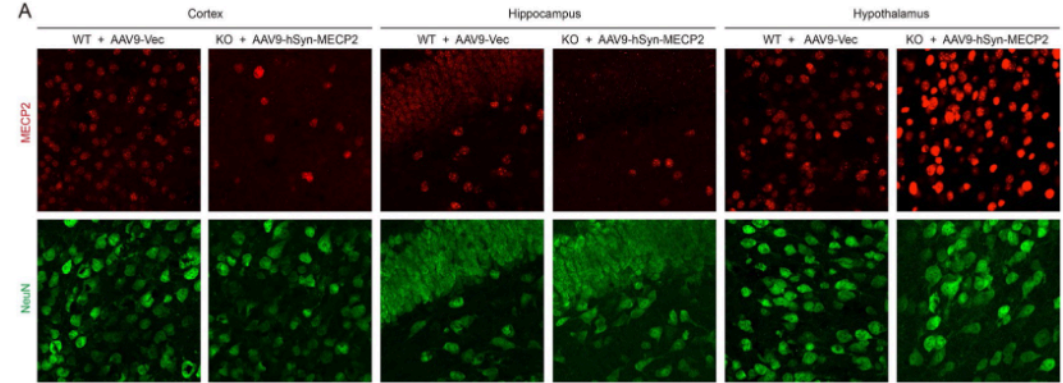
Ni trop faible, ni trop élevée...
**La quantité de protéine MeCP2
présente dans les cellules
doit être optimale**



Hélas, avec les thérapies géniques actuelles, la ré-expression N'EST PAS optimale

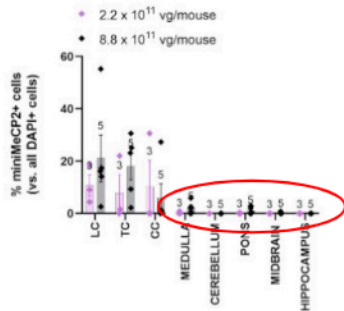
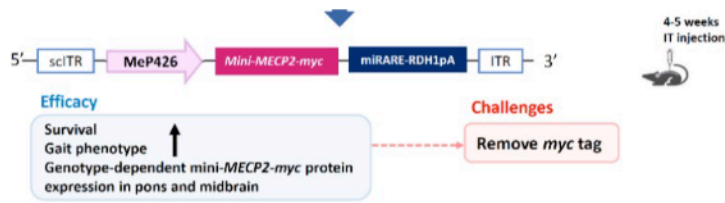


Gadalla et al, 2017 *Mol Ther Methods Clin Dev*



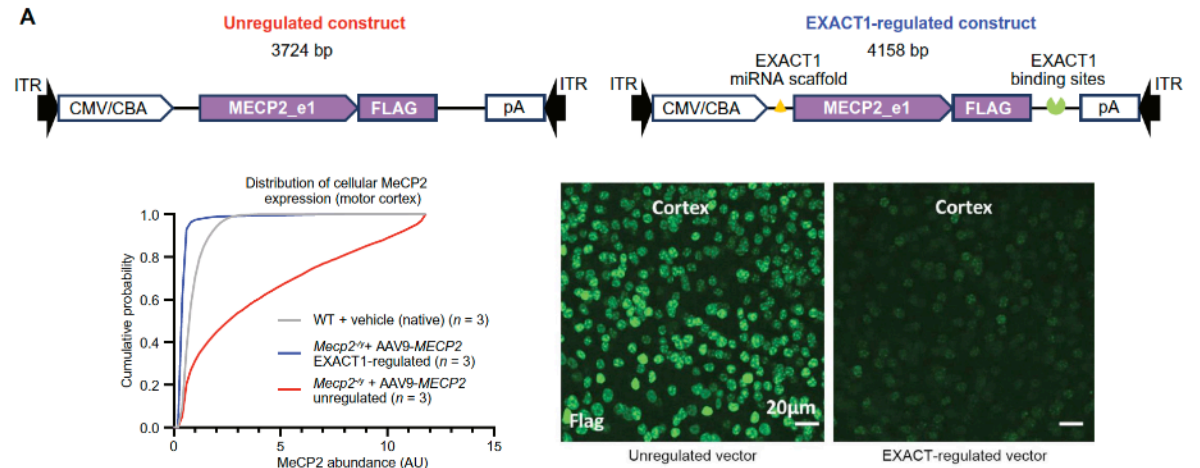
Yang et al, 2023 *Neurosci Bull*

Sinnett et al., 2021



Sinnett et al, 2021 *Mol Ther*

Review:
Sadhu et al. 2023 *Genes*



Ross et al, 2025 *Sci Transl Med*

Objectifs du projet

Development of New Molecular Options for the Treatment of Rett Syndrome in MeCP2 mutant mice



- Difficulté à faire passer les vecteurs viraux dans le cerveau
- Difficulté à contrôler la surexpression du transgène



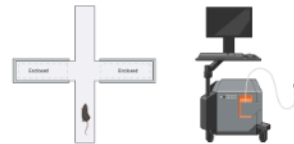
Objectif #1

Optimiser la livraison
ouverture de la BHE/vecteurs à
tropisme neuronal

Objectif #2

Réguler les taux de protéine MeCP2
nucléaire en interférant avec son
transport nucléaire

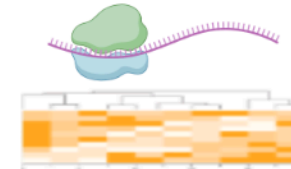
Partie 1
*Analyse du
comportement et de
l'activité cérébrale*



Partie 2
*Imagerie optique
"multi-niveaux" de la
morphologie
neurona*

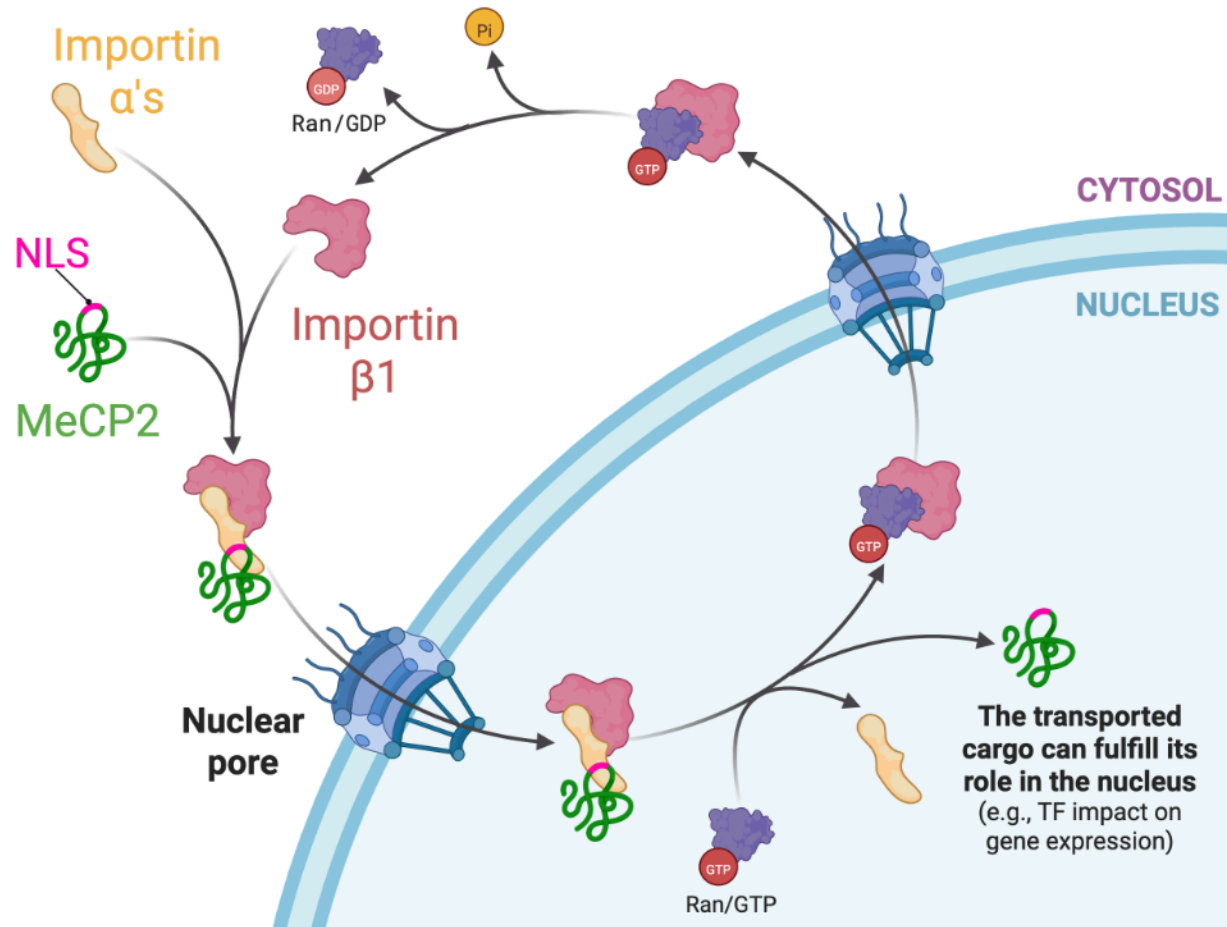


Partie 3
*Protéomique /
Translatomique
neurona*



- Étude de l'impact de la thérapie génique optimisée chez les souris T158M et R306C
- **Manipulation du transport nucléaire de MeCP2 lors de la thérapie génique** chez les souris T158M et R306C

Importines et transport nucléaire de protéines



➤ **Importine α** → Reconnaissance du signal de localisation au noyau (ou NLS) dans le cargo (par exemple: MeCP2)

➤ **Importine β 1** → Liaison + Translocation du complexe **Imp α -Cargo^{NLS}**

Reviews:

Wing et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022

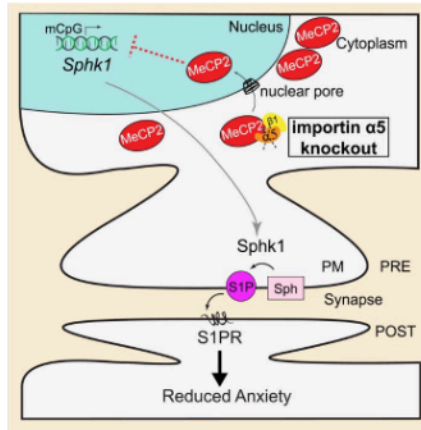
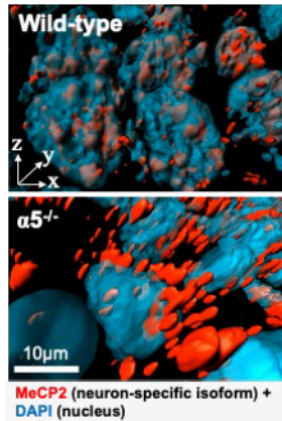
Görlich & Kutay *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999

Importines et fonctions neuronales



Cell Reports

Importin $\alpha 5$ Regulates Anxiety through MeCP2 and Sphingosine Kinase 1



Panayotis et al. *Cell Reports* 2018

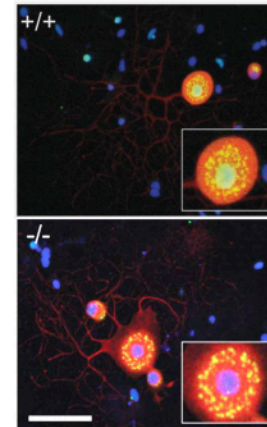
Rôle de l'importin $\alpha 5$ = **ANXIÉTÉ**

- via le transport de MeCP2
- dans les neurones de l'hippocampe

NEUROSCIENCE

Importin $\alpha 3$ regulates chronic pain pathways in peripheral sensory neurons

Science



importin $\alpha 3$ deficient neuron

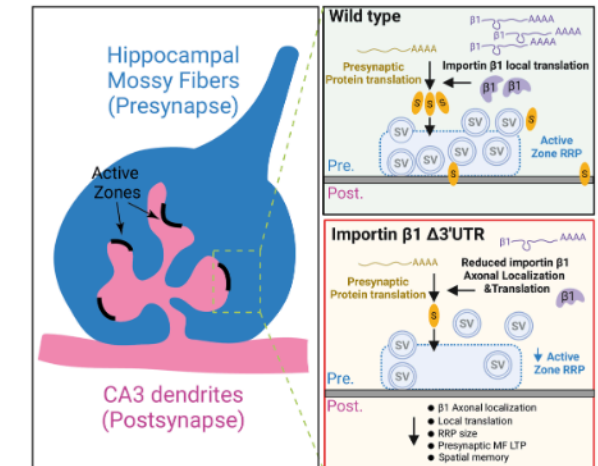


Marvaldi, Panayotis et al. *Science* 2020

Rôle de l'importin $\alpha 3$ = **DOULEUR**

- via le transport de c-FOS
- dans les neurones sensoriels (ganglions dorsaux)

Subcellular depletion of importin $\beta 1$ impairs presynaptic local translation and spatial memory.

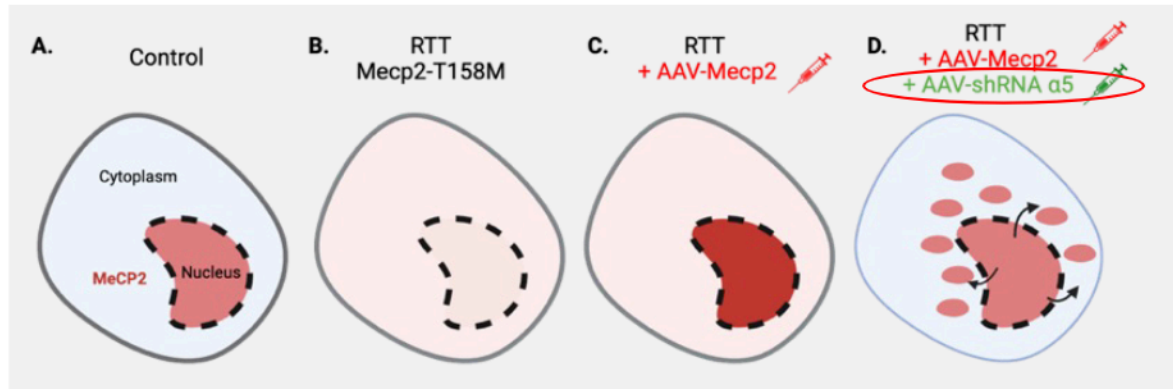


Freund/Panayotis et al. *Provisionally accepted*

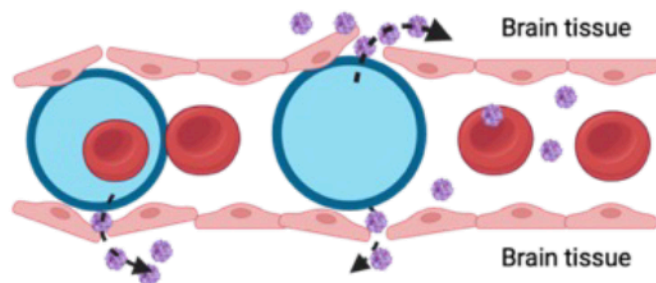
Impact de l'importin $\beta 1$ = **MEMOIRE SPATIALE**

- 'fibres moussues' de l'hippocampe

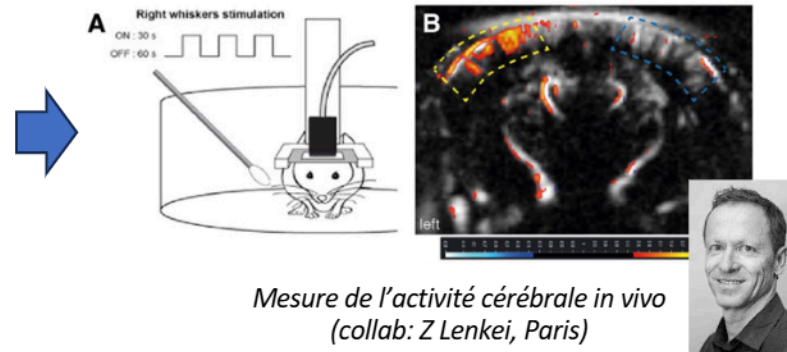
1. Etude du comportement et de l'activité cérébrale après thérapie génique et modulation du transport nucléaire



- shRNA validés pour réduire l'expression d'importine alpha5 (Panayotis et al, 2018 Cell Rep)
- même en cas de surexpression de MeCP2= souris modèle MDS (Freund et al, en preparation)
- Dual AAV (thérapie génique et modulation du transport avec AAV-PhP.eB)



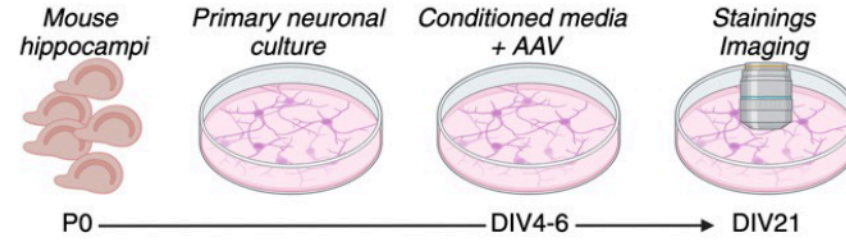
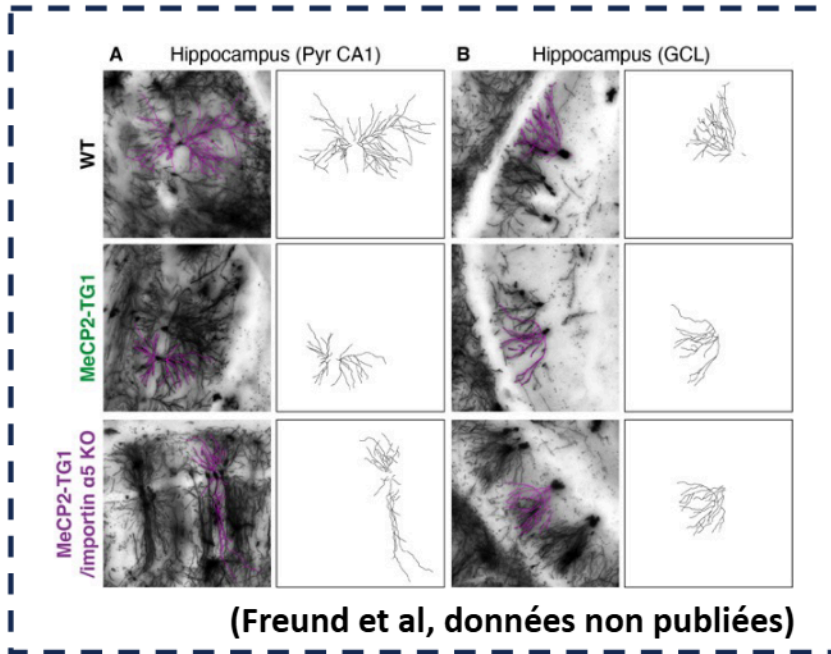
Traitement (veine caudale, microbulles, AAV-PhP.eB)



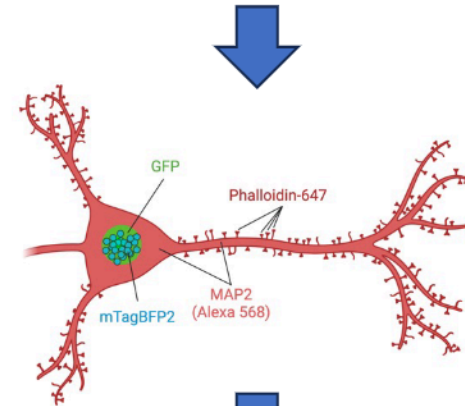
Mesure de l'activité cérébrale in vivo (collab: Z Lenkei, Paris)

Analyse du comportement (motricité, anxiété, interactions sociales, mémoire..)

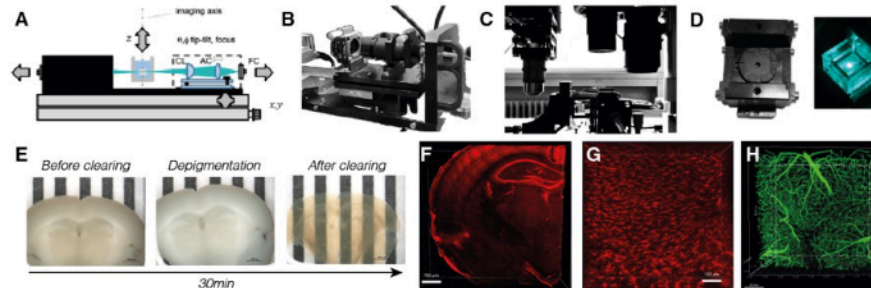
2. Impact des niveaux d'expression et de la localisation de MeCP2 sur la morphologie neuronale



Culture de neurones hippocampiques de souris (MeCP2-T158M, R306C traitées apres thérapie génique ou thérapie génique + modulation importine α5)



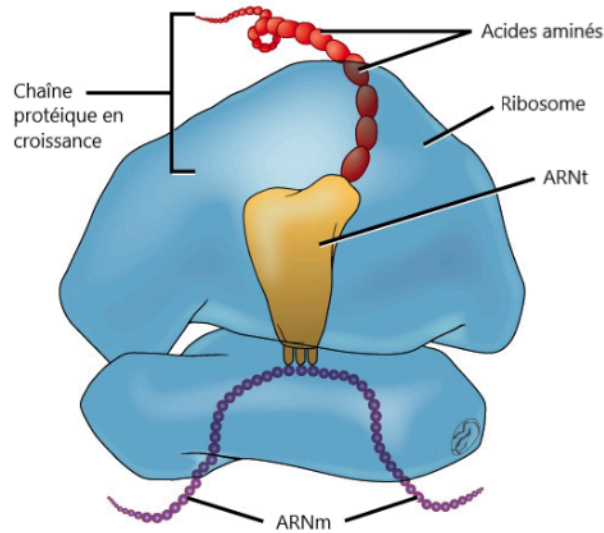
Marquages fluorescents = Analyse de la taille de l'arborisation dendritique, du nombre d'épines dendritiques.



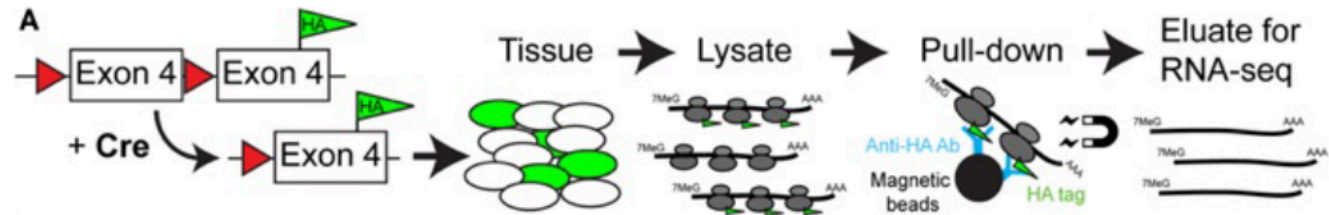
Analyse de la morphologie neuronale sur des cerveaux transparents (collab: M Oheim)



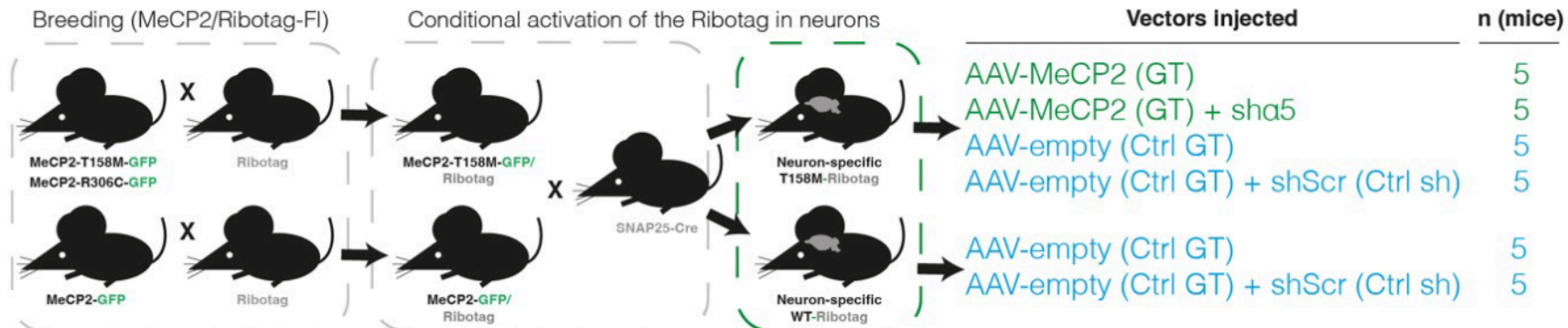
3. Etude du “translatome” après thérapie génique optimisée



Méthode “**RiboTag**” : Focus sur les mRNA prêts à être traduits en protéines.



Analysis Restricted to the mutation(s) ameliorated by the optimized gene therapy ONLY.



- Ici on ne joue pas sur le transport de MeCP2

A

MeCP2 (264)

TAD DBD 2A CFP

Regulated MeCP2 Level

Synthetic Cascade

Negative Feedback

MeCP2

YFP

Syn Prom

MeCP2 YFP 2A DBD

B

Gene Network Characterization

HEK transfection & Microscopy

Output - YFP (a.u.)

sTF (VP16-Gal4BD) - CFP (a.u.)

14 UAS_o

8 UAS_o

5 UAS_o

3 UAS_o

C

AAV packaging

Validations (neurons)

In vivo analyses

Neuronal morphology

Behavior

AAV-PhP.eB

A portrait of a young woman with long, wavy brown hair, wearing large, round, dark-rimmed glasses and a white ribbed sweater. She is smiling slightly and looking directly at the camera. The background is a soft-focus outdoor setting with green foliage.

moi

Raisons d'espérer ? Oui !

- **Progrès** en thérapie génique **impressionnants**.
- **Les efforts** pour obtenir des systèmes sûrs et optimisés sont **considérables** (vs. autres maladies rares).
- **SynBio** = perspectives sans précédent pour doser le transgène.
- Pleins d'autres idées (édition, XCI, transport nucléaire, etc.).

Cependant, l'espoir n'est légitime UNIQUEMENT SI:

- **Préclinique** associé à des **données fondamentales solides** ;
- Étude de modèles pertinents (mutations spé, tests aussi chez femelles);
- Partage des technologies (fUS/nouvelles capsides AAV) !



À l'heure actuelle, les investisseurs + gouvernements sont frileux sur les nouveaux investissements en thérapie génique (très coûteux, peu de garantie de gain) dans le domaine des maladies rares (pas assez de patients).

C'est précisément parce que l'intérêt des investissements industriels et/ou privés fluctue au gré du vent que nous avons besoin que la recherche publique s'y investisse dans l'intérêt des patients.

Merci pour votre attention et votre support !

Nos étudiants/collaborateurs

SPPIN | SAINTS-PERES
Paris Institute for
the Neurosciences



Yoann Leblay



Martin Oheim



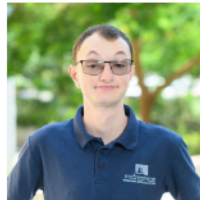
Mathieu Morel



Urszula Latosz



Zsolt Lenkei



Philip Freund



Marseille
Medical
Genetics



Jean-Christophe Roux

+ tous nos collègues
qui aident à la réalisation
de ces projets au quotidien !

Nos financeurs

