

2^{ème} Réunion de la Dyskinésie
Ciliaire Primitive (DCP)
Paris 11 octobre 2009

Essai de thérapie génique dans la
DCP

Patrice Bouvagnet

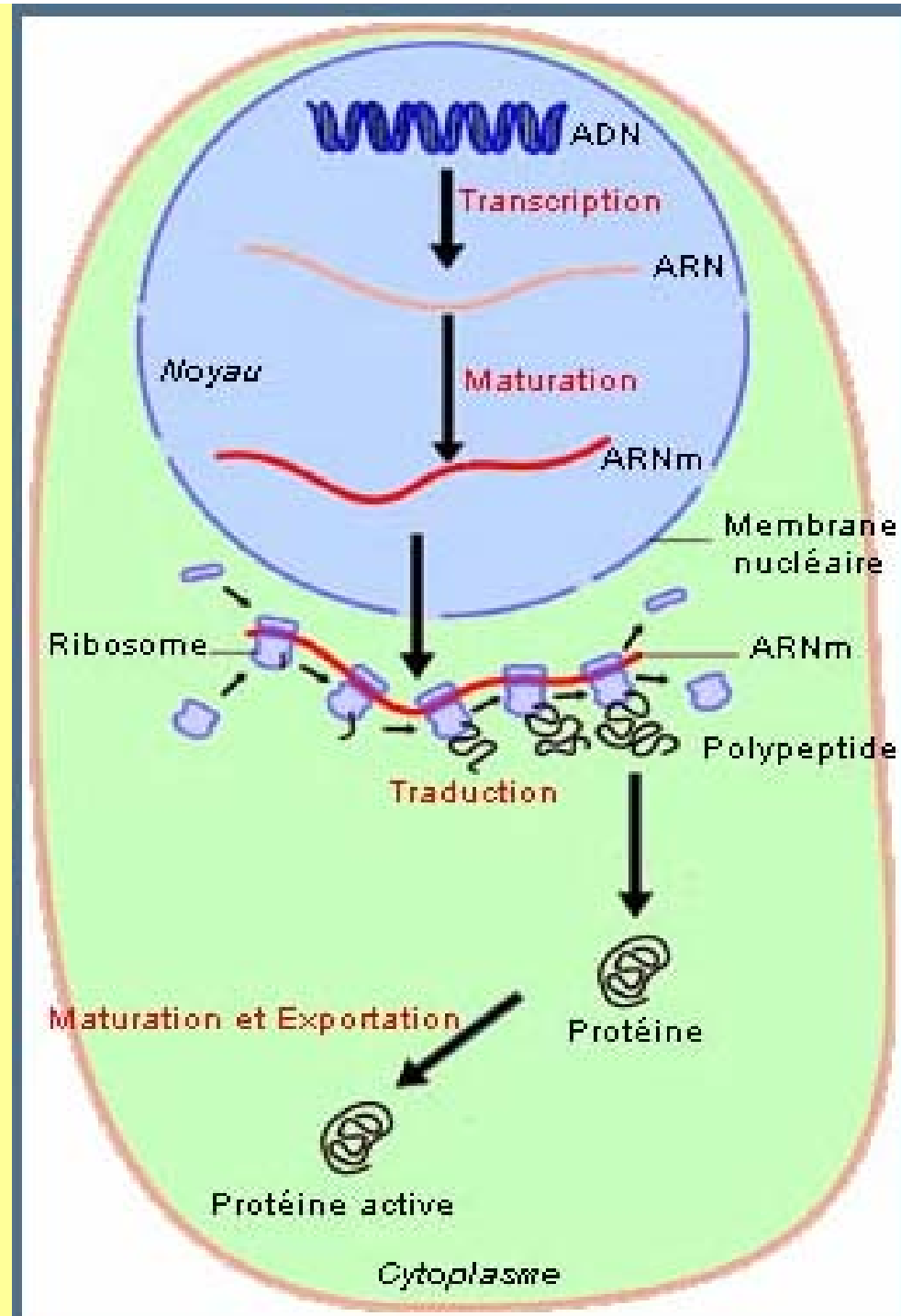
La DCP est une maladie génétique

- Nous avons 25 000 gènes en 2 copies :
 - 1 copie d'origine paternelle
 - 1 copie d'origine maternelle

50 000 copies de gènes
- Une DCP apparaît si les 2 copies d'un certain gène sont mutées

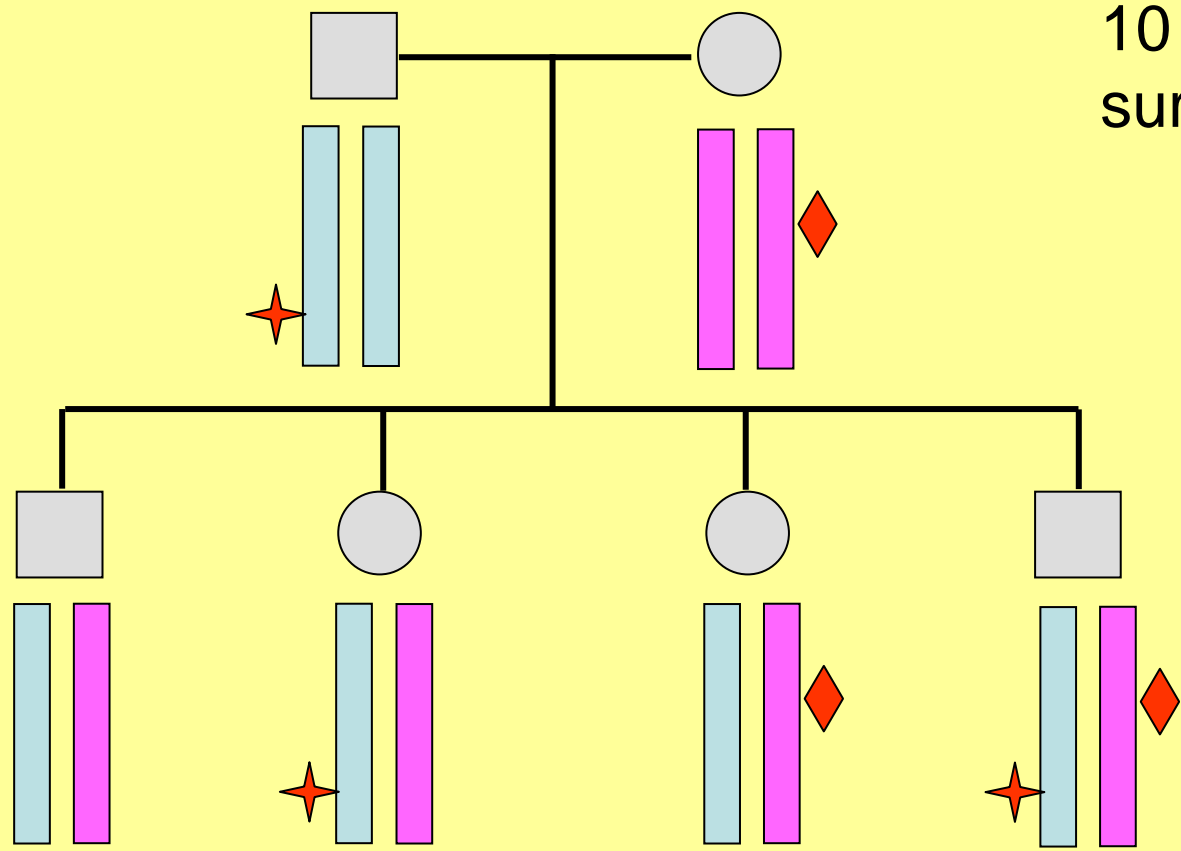
Du gène à la protéine

- Comment la cellule fabrique-t-elle les protéines à partir des gènes ?



DCP : Transmission autosomique récessive

10 - 15 mutations sur les 25 000 gènes



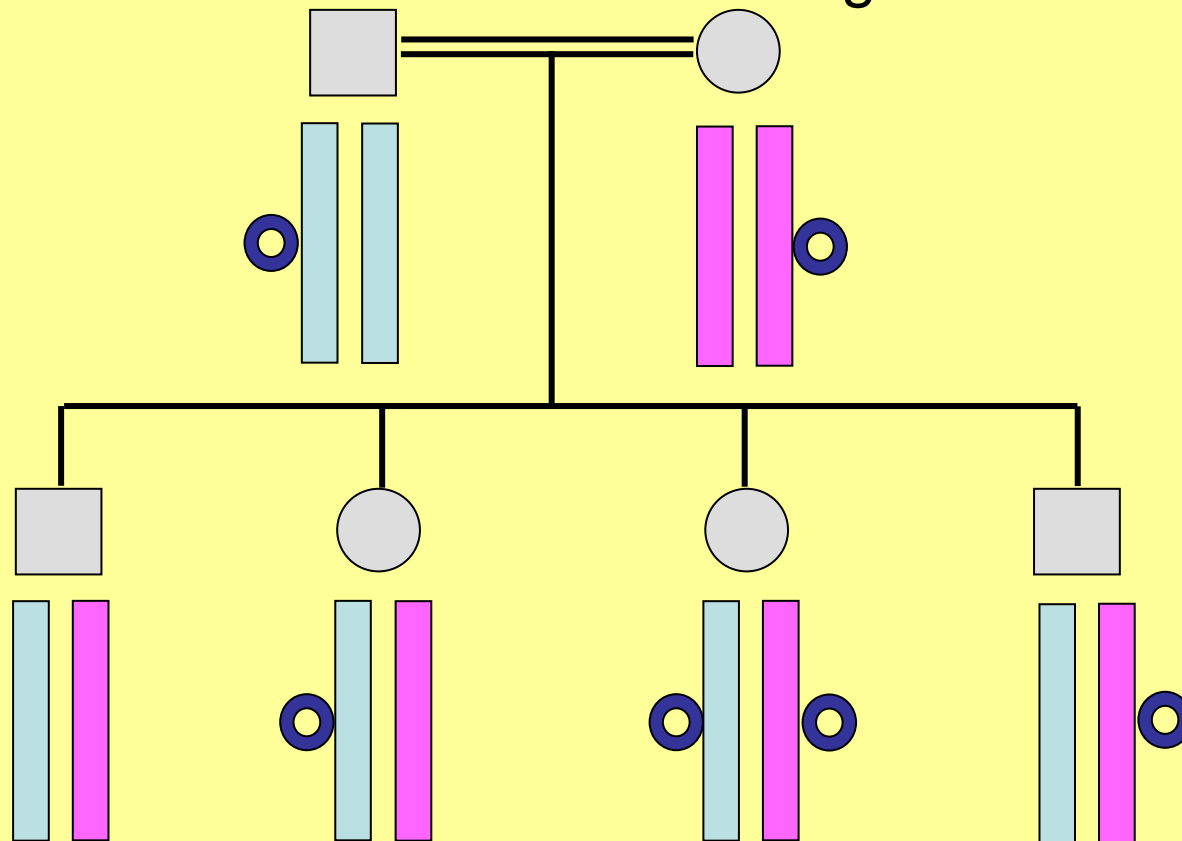
$\frac{1}{4}$ des enfants

DCP et consanguinité

Mariages :

Oncle/niece : $1/8$ (12,5%) gènes communs

Cousins germains : $1/16$ gènes communs



$1/4$ des enfants

Hypothèse pour la thérapie génique



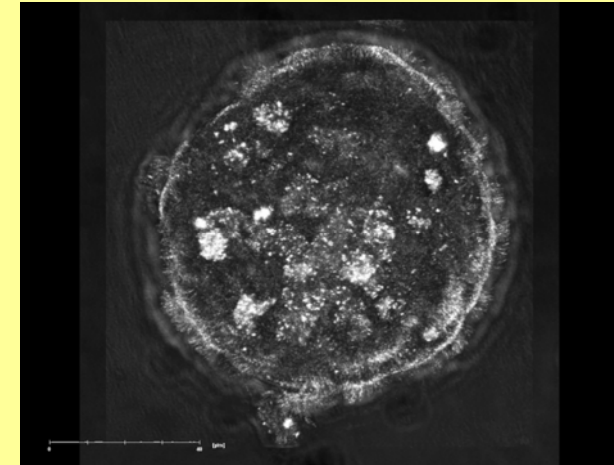
Etapes de thérapie génique

- Amener le gène médicament dans la cellule
- Le gène médicament doit être transcrit (fabrication d'ARN)
- L'ARN doit être traduit (fabrication de protéine)
- La protéine doit fonctionner donc le cil battre à nouveau !

● Système de culture :

Pr Mark Jorissen

Jour du prélèvement : **cellules ciliées**



Répartition sur collagène à J+1

Apparition de cils

1ère semaine

2ème semaine

3ème semaine

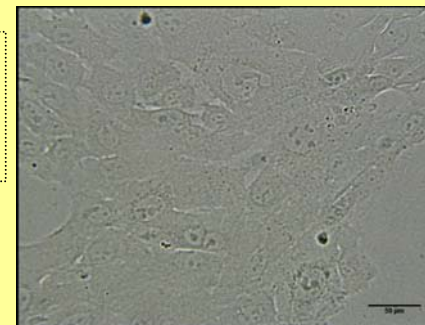
4ème semaine

Digestion du collagène et remise en suspension :

redifférenciation

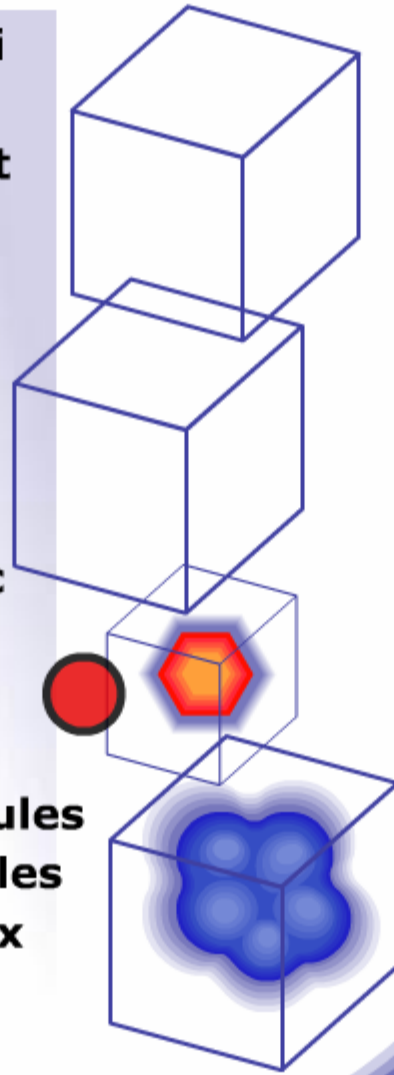
Adhérence et prolifération : perte des cils,

dédifférenciation



VECTEUR : un LENTIVIRUS

Les rétrovirus sont ainsi dénommés car leur matériel génétique n'est pas constitué d'ADN, mais d'ARN qui est ensuite transformé en ADN au sein de la cellule, lors de leur cycle de réplication. Les virus intègrent donc leur matériel génétique dans le génome de la cellule hôte. Ils ne sont utilisés que sur des cellules qui se divisent. Ce sont les premiers vecteurs viraux qui ont été utilisés en thérapie génique.

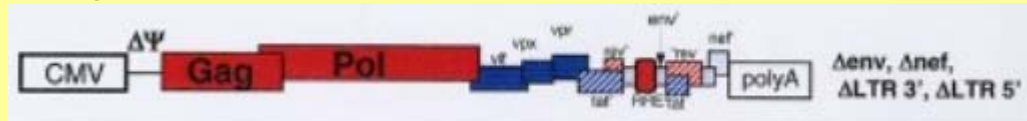


Rétrovirus

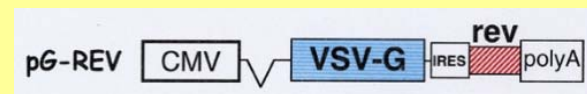


Le LENTIVIRUS est préparé en 3 morceaux !

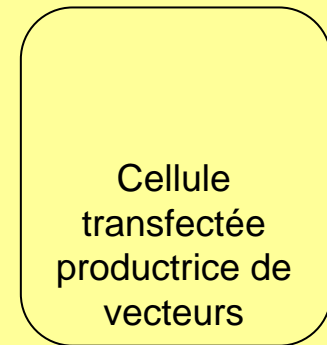
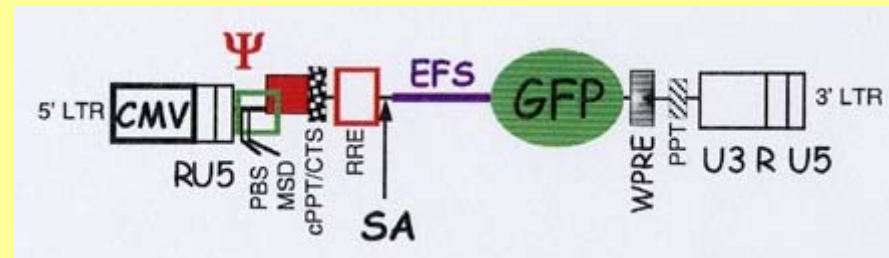
Fonctions auxiliaires : *gag*, *pol*, gènes régulateurs



Fonction auxiliaire : *env* (*pseudotype*)



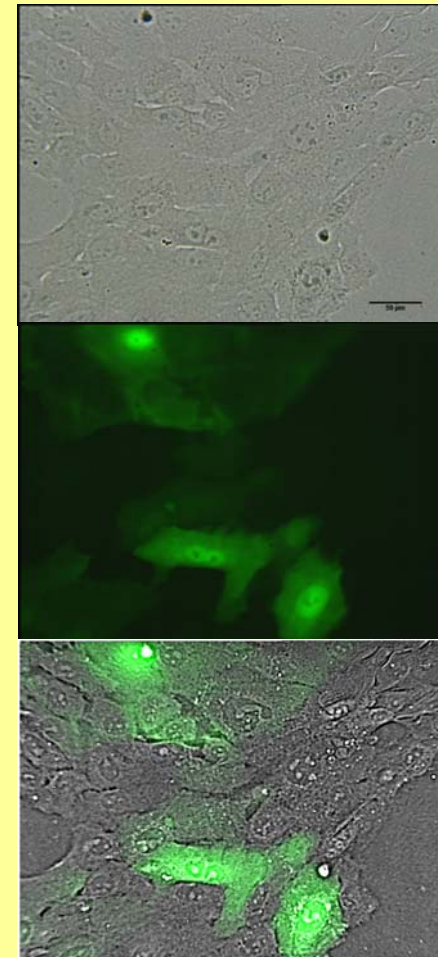
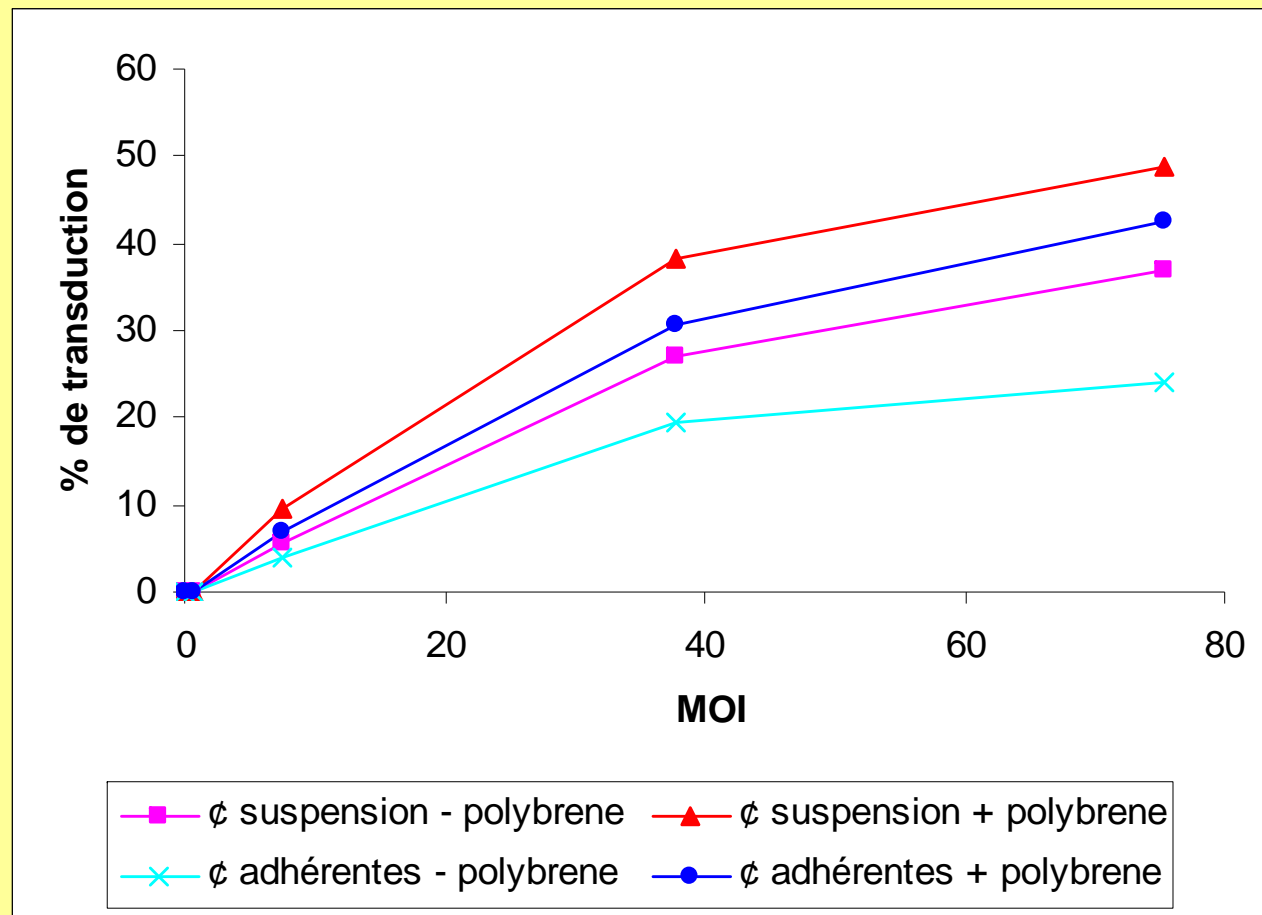
Vecteur lentiviral



QUESTION 1 :

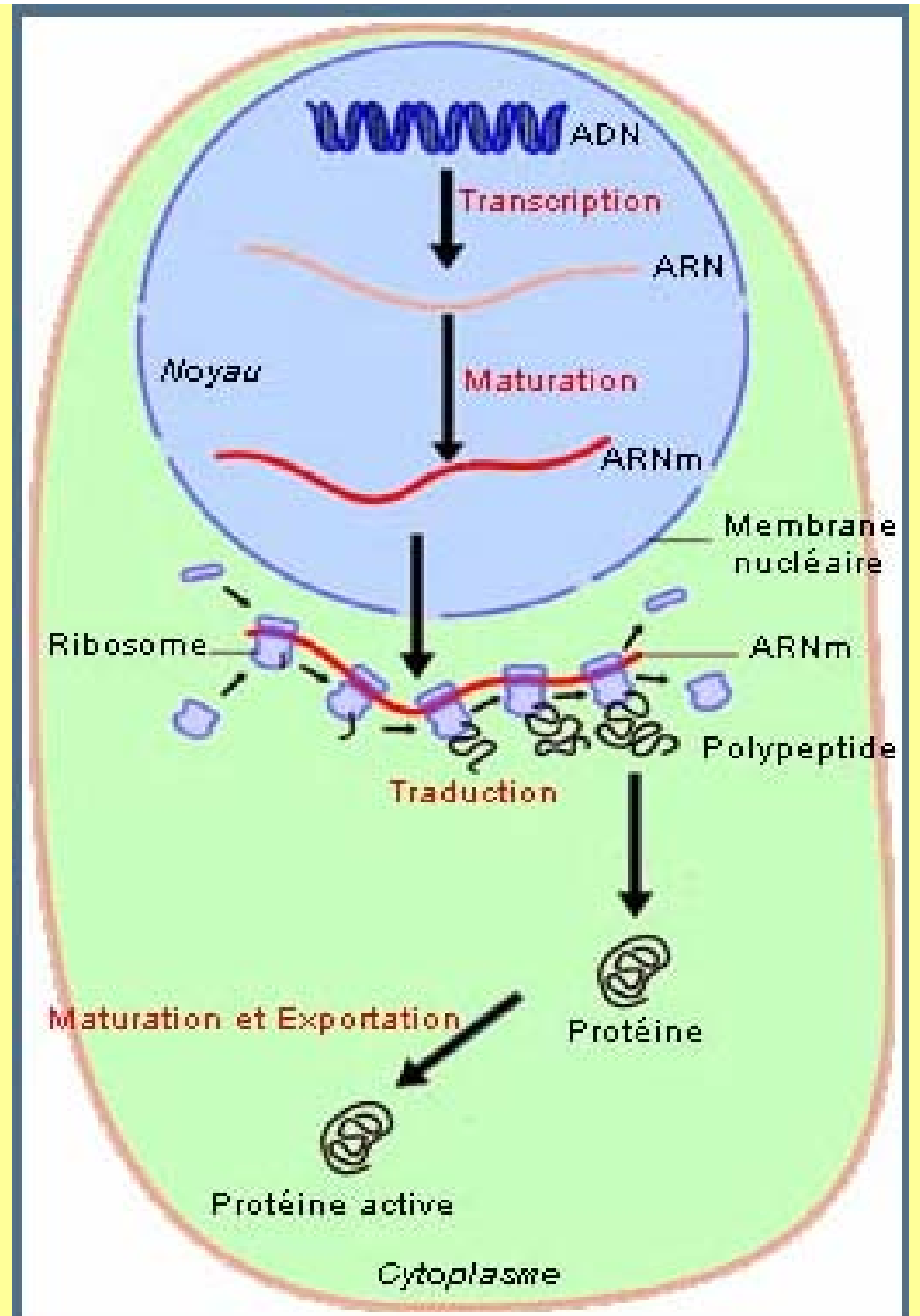
Est-ce que le lentivirus va introduire le gène dans la cellule ?

- Efficacité de transduction de cellules épithéliales respiratoires humaines avec GFP



Du gène à la protéine

QUESTION 2 :
Est-ce que le gène médicament est utilisé pour fabriquer de l'ARNm ?



3- Détection de *DNAI-1* étiqueté dans des cellules épithéliales respiratoires normales infectées

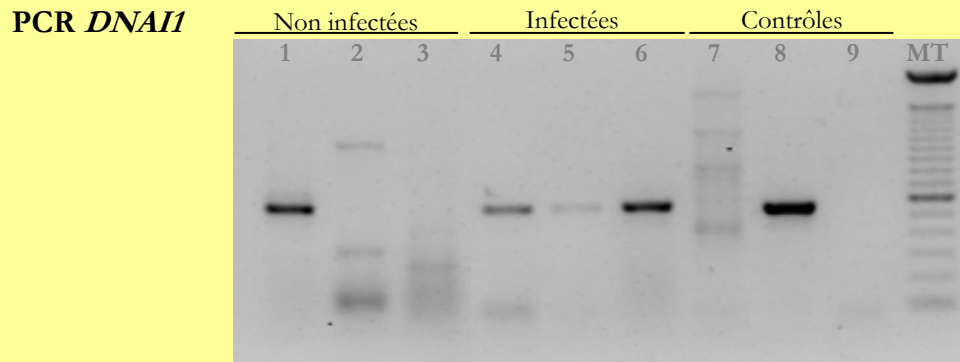
- Transcription de *DNAI-1* étiqueté HA dans les cellules infectées :

PCR en utilisant des amorces spécifiques de *DNAI-1*

Amorces de RT spécifiques de *DNAI1* (P5) ou de l'étiquette HA (HA),

Cellules non-ciliées (NC) ou re-ciliées (RC).

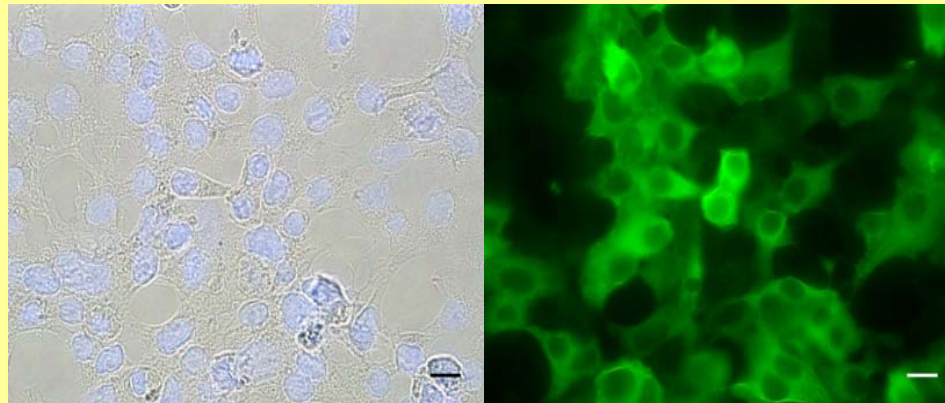
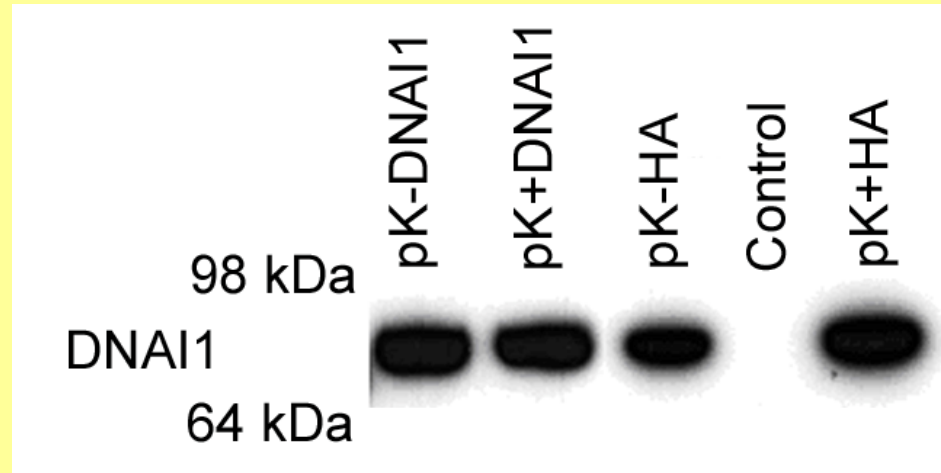
PCR *DNAI1*



produit RT	matrice	: RC	RC	NC	RC	RC	NC	ADNg	pBHA	-
	amorce	: P5	HA	P5	HA	HA	HA			
	Virions				BHA	NHA	BHA			

⇒ Validation de la transcription à partir des constructions

Question 3 : est-ce que la protéine médicament est produite ?

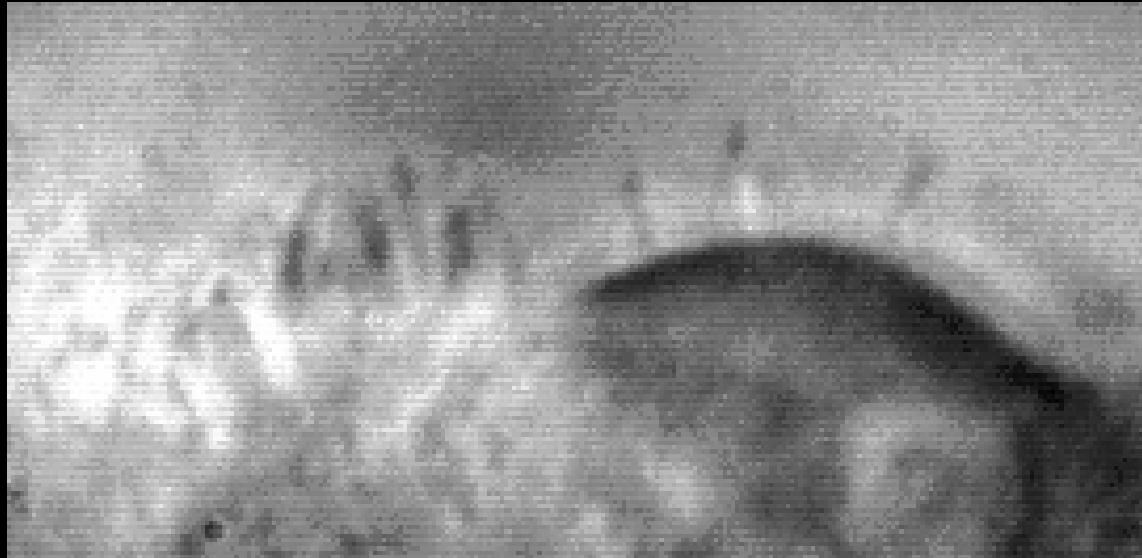


Barres d'échelle, 10 μ m

QUESTION 4 : Est-ce que le gène médicament peut rétablir un battement ciliaire normal ???

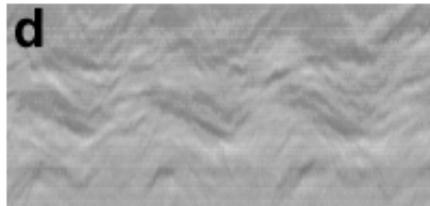
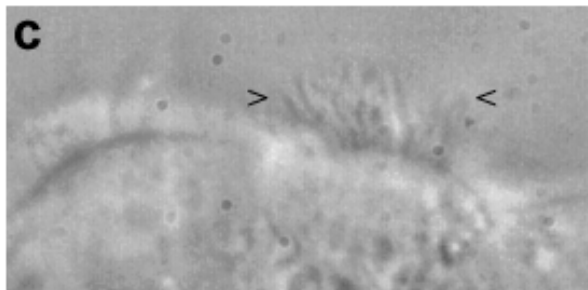
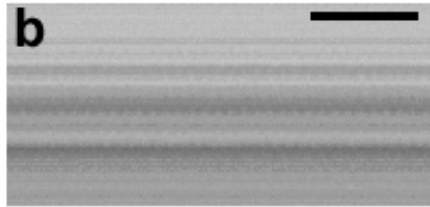
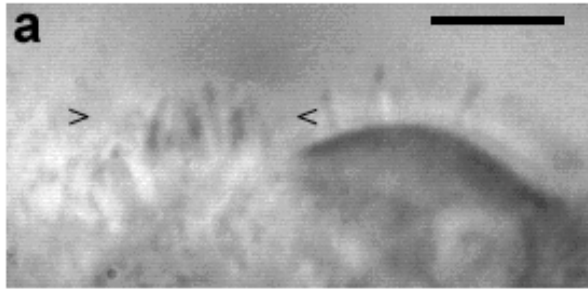
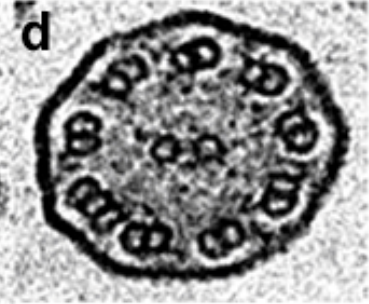
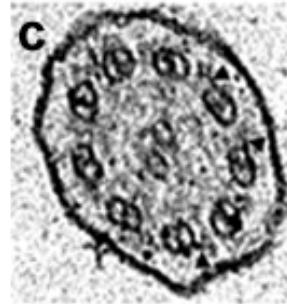
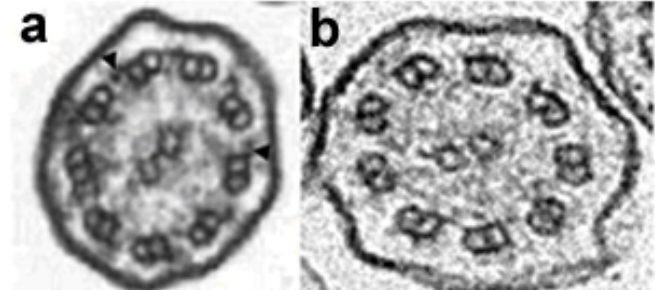
- Il faut obtenir des cellules ciliées humaines déficientes pour le gène DNAI1
- Il faut prélever 2 fragments :
 - 1 fragment pour être « traiter »
 - 1 fragment contrôle

VIDEO après TRAITEMENT contrôle



VIDEO après TRAITEMENT DNAI1



5A**5B**

Panel A: At J'+31, vesicles had cells with cilia transduced with either pGFP (A-A) or pK-*DNAI1* vectors (A-C). However, cilia of cells transduced with pGFP were immotile whereas cells transduced with pK-*DNAI1* vectors were beating. Figures (A-B) and (A-D) represent the variations of the video signal during the time of recording (400 msec) along a virtual line delimited by the ">" and "<" signs on figures (A-A) and (A-C), respectively. The periodic beat of cilia is clearly visible on figure (A-D) compared to the immotility of cilia on figure (A-B). Black bar on figure (A-A): 10 μ m. Black bar on figure (A-D): 100 msec. *DNAI1*-mutated HAECs transduced with pK-*HA* vector containing *HA*-tagged *DNAI1* cDNA sequence gave identical results (data not shown). See videos S1 and S2.

Panel B: Axoneme ultrastructural analysis by TEM (A-D): (B-A) Normal HAEC. (B-B) *DNAI1*-mutated HAEC treated with pGFP. (B-C) *DNAI1*-mutated HAEC treated with pK-*DNAI1* vector. (B-D) *DNAI1*-mutated HAEC treated with pK-*HA* vector. Arrowheads indicate ODA. Axoneme diameter is about 0.2 μ m.

Conclusion :

- Démonstration de la
« preuve du concept »



Et la suite ?

- Modèle animal : souris KO
 - Mesure de l'impact sur les cellules in vivo et sur les cellules non-épithéliales ciliées
- Ciblage cellulaire :
 - Cellules infectées ciblées ou/et expression du gène ciblée
- Vecteur optimisé

VECTEUR

- Lentivirus comme vecteur :
 - Avantages : insertion du gène dans chromosome, peu immunogène
 - Inconvénient : petit, insertion du gène dans chromosome !
- Virus herpes :
 - Grande capacité, pas d'insertion dans chromosome mais chromosome artificiel
 - Infection des cellules épithéliales ciliées ?

Remerciements

- Le patient + la patiente atteints de DCP
- Brigitte Chhin, doctorante (thérapie génique)
- Brigitte Aime, Christophe Ollagnier (Diagnostic moléculaire)