

Association Dyskinésie Ciliaire Primitive

5, rue Plantevin
42000 Saint Etienne



**PLAIDOYER POUR UN PROJET
DE
THÉRAPIE GÉNIQUE**

SOMMAIRE

Quand la nature fait bien les choses	3
Quand la nature tousse	3
Comment s'appelle cette maladie ?	4
Comment se présente cette maladie ?	4
Quelle est la cause de cette maladie ?	4
Comment sait-on qu'on est atteint de cette maladie ?	4
Est-il possible de diagnostiquer cette maladie devant des infections respiratoires récidivantes isolées ?	5
Comment traiter cette maladie ?	6
Est-il possible de rétablir un battement ciliaire normal et de guérir la maladie ?	7
Est-ce que des tentatives ont déjà été faites ?	7
Quelles sont les prochaines étapes ?	8
En dehors de la démonstration de « la preuve du concept » qu'avez-vous appris de cette première étape qui sera utile pour la suite ?	8
Comment est envisagée la suite du travail ?	9
Est-ce que ces virus (virus Herpès simplex et baculovirus) sont capables d'infecter les cellules épithéliales ciliées ?	9
Quelle sera la durée de l'expression du gène-médicament ?	10
Le gène-médicament ainsi apporté risque-t-il d'intégrer un chromosome ?	10
Quelle sera l'espèce animale utilisée pour cette 2^{ème} étape en vue d'une thérapie génique humaine ?	10
Comment pourrez-vous déterminer quand l'étape 2 sera réussie permettant de passer à l'étape 3 de thérapie génique humaine ?	10
Quel est le budget nécessaire pour réaliser ce 2^{ème} pas vers la thérapie génique humaine ?	10

Quand la nature fait bien les choses :

L'intérieur des cavités du nez, des sinus, de la trachée, des bronches jusqu'au bout de l'arbre bronchique est tapissé de cellules particulières. Ces cellules épithéliales sont munies de « petits doigts » qui sont appelés des cils. Ces cellules sont donc appelées cellules épithéliales ciliées. Chacune de ces cellules présente plusieurs dizaines de cils qui sont mobiles. Ils ont un mouvement coordonné qui ressemble à un mouvement de bras lors d'une holà dans un stade de football. La synchronisation n'intéresse pas que les cils d'une même cellule ciliée (comme les 2 bras d'un spectateur) mais aussi les cellules voisines (comme les spectateurs vous entourant dans un stade de football). Ce mouvement coordonné permet à ces cils minuscules (quelques nanomètres soit quelques millièmes de millimètres !) d'avoir suffisamment de force pour déplacer des particules introduites dans les voies respiratoires lors de la respiration. Ces particules sont des poussières mais aussi des microbes comme des bactéries. La direction de la « holà » des cils n'est pas aléatoire. Au contraire, elle est orientée de telle sorte que le mouvement des cils poussent les microbes vers la « sortie » c'est-à-dire l'oropharynx où d'un raclement de gorge ils seront déplacés vers le début du tube digestif pour être détruits. Ce battement est permanent et involontaire, il nous protège en permanence contre les infections bactérienne et n'est diminué que lors de la prise de toxique (tabac) ou d'infection.

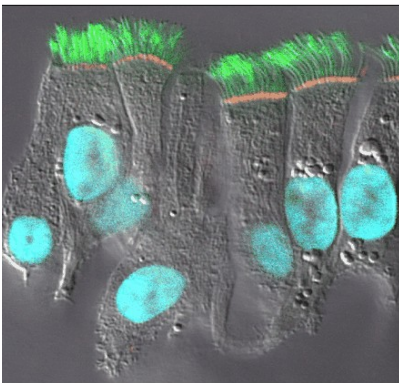


Figure 2 : cellules épithéliales bronchiques humaines. Les noyaux sont colorés en bleu, les cils en vert et le canal CFTR (responsable de la mucoviscidose en rose. Notez au milieu une cellule sans cil et sans CFTR. Il s'agit d'une cellule appelée « goblet ». (Molecular Biology of the Cell, 2005).

Quand la nature tousse :

Il peut arriver que le battement permanent de ces cils soit perturbé : le battement est plus lent (normalement 12 battements par seconde !), moins fort, moins ample, non coordonné. Il peut arriver que les cils soient trop longs, trop courts voire absents. Il peut arriver que les cils soient totalement immobiles. Dans tous ces cas, le drainage des particules et microbes inhalés lors de la respiration ne se fait plus ou se fait mal. Les microbes et notamment les bactéries ne sont plus évacuées de l'arbre respiratoire ce qui favorise les infections respiratoires : sinusites, bronchites en particulier. Ce dysfonctionnement est dû à une anomalie dans une des nombreux composants des cils. En effet, pour fonctionner normalement un cil a besoin de plusieurs centaines de molécules qui interagissent dans une mécanique d'une incroyable précision. Ce composant (en réalité cette protéine) est défectueux du fait d'une anomalie dans sa fabrication liée à une anomalie dans le gène qui permet sa synthèse. La « panne » est donc permanente dès la naissance et pendant toute la vie. Mais, 2 personnes atteintes de DCP n'ont pas forcément la même panne (la même pièce défectueuse).

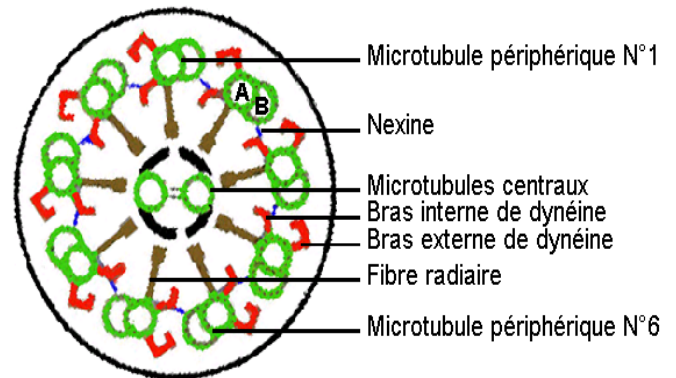


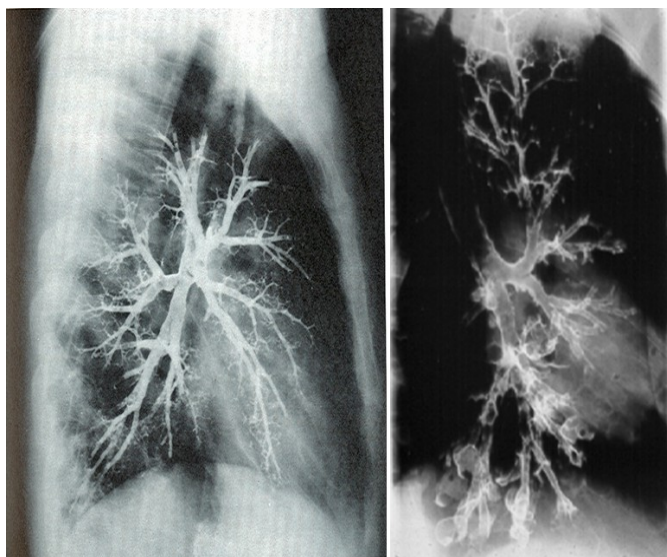
Figure 3 : schéma d'une coupe transversale d'un cil. Il s'agit d'une organisation très structurée avec 9 paires de microtubules en périphérie du cil (en vert) et d'une paire de microtubule centrale. Les bras internes de dynéine sont les moteurs du cil. Ils sont représentés en rouge. Les fibres radiaires participent à la solidité de l'assemblage des protéines du cil. Encyclopédie MédicoChirurgicale, 11 940 F 50, 2004.

Comment s'appelle cette maladie ?

Plusieurs noms ont été donnés à cette maladie et le nom maintenant le plus souvent utilisé est celui de Dyskinésie Ciliaire Primitive. Dyskinésie : car il s'agit d'un mouvement anormal ; Ciliaire : car il s'agit d'une dysfonction des cils de ces cellules épithéliales ; Primitive : car l'origine est génétique. En abrégé : DCP.

Comment se présente cette maladie ?

Du fait du drainage incorrect des voies respiratoires secondaires au dysfonctionnement des cils, la personne atteinte va présenter des infections respiratoires (sinusites, bronchites en particulier) dès la naissance (typiquement avant de sortir de la maternité !) et pendant toute sa vie. Ces infections récidivantes amènent à l'apparition de polypes dans les cavités nasales et à une destruction des bronches (dilatation des bronches). La maladie peut évoluer vers l'insuffisance respiratoire et à la greffe de poumons.



Arbre bronchique normal

Dilatation des bronches

Figure 4 : ces radiographies montrent les bronches normales à gauche et dilatées à droite. (radiographies du Dr R. Lazor, Centre Référence Maladies Orphelines Pulmonaires, Lyon).

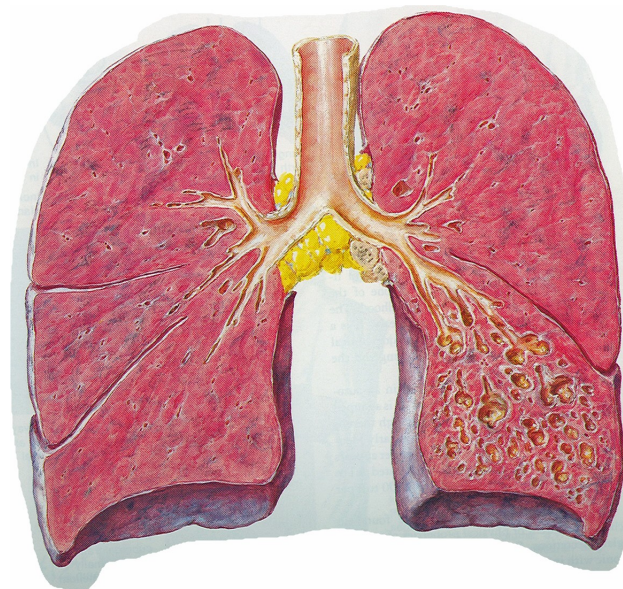


Figure 5 : dessin montrant en bas et à droite un lobe pulmonaire avec dilatation des bronches et destruction pulmonaire. Ces lésions sont si importantes que le lobe pulmonaire doit être enlevé chirurgicalement.

Quelle est la cause de cette maladie ?

La DCP est une maladie génétique autosomique récessive, c'est-à-dire qu'elle est secondaire une mutation dans un gène. En réalité, nous avons 2 copies de chacun de nos 28 000 gènes. Dans le cas de la DCP, il faut que les 2 copies d'un gène soient anormales pour entraîner la maladie. Comme le cil a besoin de nombreux composants pour battre normalement, il suffit que les 2 copies d'un des composants soient anormales pour que la maladie apparaisse. Les personnes atteintes n'ont donc pas la même anomalie génétique c'est-à-dire que ce n'est pas forcément le même gène qui est atteint ni la même mutation. On connaît déjà une dizaine de gènes impliqués dans cette maladie et le premier incriminé a été le gène *DNAI1*.

Comment sait-on qu'on est atteint de cette maladie ?

Affirmer que quelqu'un est atteint de cette maladie est difficile. Il n'est pas rare que le diagnostic de cette maladie soit porté tard dans la vie parce que présenter des infections respiratoires récidivantes peut faire partie d'autres maladies. Le diagnostic peut parfois être porté sur des arguments cliniques simples. Par exemple, présenter des infections respiratoires récidivantes (sinusites, bronchites) et une inversion droite/

gauche des organes thoraciques et abdominaux (le cœur est à droite au lieu d'être à gauche, le foie est à gauche au lieu d'être à droite) permet d'affirmer qu'il s'agit d'une DCP avec situs inversus (inversion droite/gauche des organes thoraciques et abdominaux). Cette association infections respiratoires récidivantes et situs inversus a été décrite pour la première fois par le Dr Kartagener qui a donné le nom de « syndrome de Kartagener ».

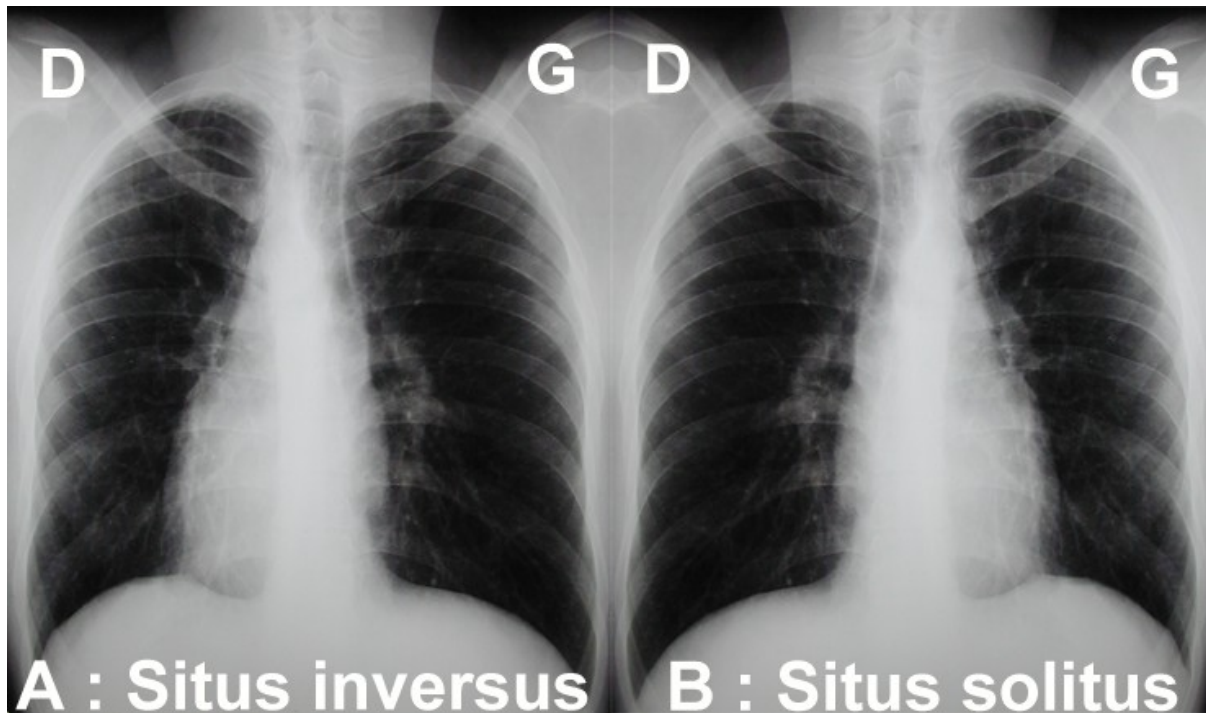


Figure 6 : Voici 2 radiographies thoraciques. A gauche (A), la radiographie montre que le cœur est à droite. A droite (B), la même radiographie a été retournée et le cœur se trouve du côté gauche. En réalité, la « vraie » radiographie est celle de gauche (A). Cette homme est porteur d'un syndrome de Kartagener avec situs inversus (le cœur est à droite).

De même, lorsqu'un homme adulte présente une stérilité liée à des spermatozoïdes peu ou pas mobiles et des infections respiratoires, il est très probable qu'il s'agisse d'une DCP. Cette association infections respiratoires + situs inversus et/ou stérilité masculine est maintenant comprise. La nature utilise parfois un même composant (une même protéine) pour des cellules différentes. Ainsi, il est connu que certaines protéines sont utilisées pour le bon fonctionnement des cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires mais aussi pour les flagelles des spermatozoïdes (ce qui permet aux spermatozoïdes de se déplacer sur de grandes distances). Ainsi, si un tel composant est anormal, le battement des cils des cellules épithéliales et le mouvement des flagelles sera altérés. A un stade très précoce de l'embryon, certaines cellules ont un cil unique qui en battant crée un flux de liquide péri embryonnaire : c'est la première étape de la latéralisation. Si ce battement est anormal ou absent, la latéralisation de cet embryon sera aléatoire. Il pourra donc présenter un situs inversus.

Est-il possible de diagnostiquer cette maladie devant des infections respiratoires récidivantes isolées ?

Lorsque la seule expression de la maladie est caractérisée par des infections respiratoires récidivantes isolées, établir avec certitude le diagnostic est beaucoup difficile. En effet, d'autres maladies peuvent entraîner des infections respiratoires récidivantes comme par exemple un déficit du système de défense anti-infectieux (déficit immunitaire). La mucoviscidose donne aussi des infections respiratoires récidivantes. La chute de la **production de NO** (un gaz) est observée dans la DCP. Cependant, d'autres maladies peuvent donner une chute de la production de NO (faux positif) et cet examen ne peut pas être pratiqué chez enfants en bas âge (il faut une bonne coopération du patient).

Des anomalies visibles sur au niveau des cils observés en **microscopie électronique**. A ce très fort grossissement, il est possible d'observer des anomalies dans l'organisation des composantes (protéines) du

cil. Cependant, cet examen est difficile à organiser parce que peu de spécialistes en France savent interpréter les images. Cet examen peut, en outre, montrer un cil normal chez quelqu'un souffrant de DCP (faux négatif). On estime le risque d'être faussement rassuré à environ 28%.

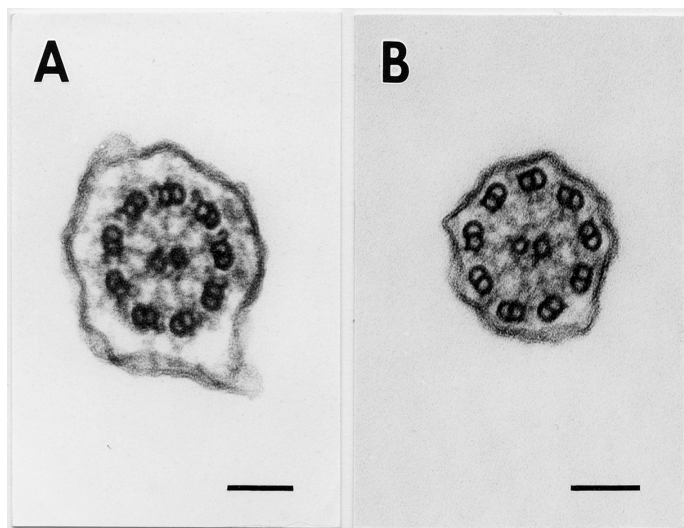


Figure 7 : cils observés avec un microscope électronique. Le cil en A est normal, mais le cil en B n'a pas de bras externe de dynéine (comparez avec le schéma de la figure 3).

Le meilleur moyen diagnostique consiste à prélever des cils dans les bronches ou la cavité nasale pour biopsie ou brossage et à **observer le battement ciliaire** immédiatement après le prélèvement ou mieux, après culture. Cette technique récente permet d'observer le battement ciliaire et de détecter des anomalies. Cette jeune technique doit encore s'améliorer en définissant quels paramètres mesurés et quelles valeurs sont normales afin de bien pouvoir identifier les battements ciliaires anormaux.

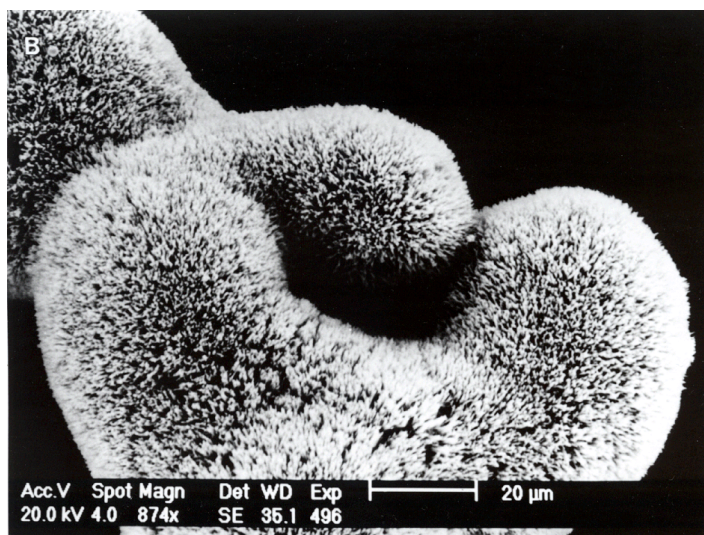


Figure 8 : Voici l'aspect obtenu avec un microscope à balayage d'un amas de cellules ciliées respiratoires après culture de ces cellules. On voit très nettement les milliers de cils qui hérissent la surface de cette vésicule.

Comment traiter cette maladie ?

A ce jour, il n'y a pas de traitement qui permette de rétablir un battement ciliaire normal. Ce déficit est permanent et incurable. Les seuls moyens de traitement consistent à compenser autant que possible le déficit de drainage des voies respiratoires. La gymnastique, les mouvements respiratoires, la kinésithérapie mais aussi le sport, le chant sont des pratiques qui permettent d'améliorer le drainage des voies respiratoires et de compenser partiellement à ce déficit. Ces pratiques qui doivent être continuées toute la vie diminuent la fréquence des infections respiratoires sans arriver à les empêcher. Il faut donc aussi traiter les infections respiratoires par des antibiotiques en particulier. Chaque personne atteinte de DCP aura un traitement antibiotique plusieurs fois par an et souvent de manière prolongée.

Malgré ces efforts, on peut voir se développer dans les sinus des polypes qu'il faudra enlever chirurgicalement. De même, les bronches soumises à des infections répétées et prolongées peuvent devenir de manière permanente dilatées (dilatation des bronches). Elles deviennent des réserves de microbes dont il devient impossible de se débarrasser à moins de les enlever par une intervention chirurgicale.

Lorsque les dégâts sont trop importants, une greffe des poumons est proposée. Mais la pénurie de donneur est une limitation importante de ce traitement lourd. De plus, il n'est pas possible de greffer de la muqueuse nasale ou des sinus. Les infections des voies aériennes respiratoires (sinusites) vont donc persister d'autant plus que la greffe impose un traitement déprimant les défenses immunitaires. Ce traitement est nécessaire pour améliorer la tolérance de ce poumon étranger mais il augmente aussi la tolérance de l'organisme aux infections.

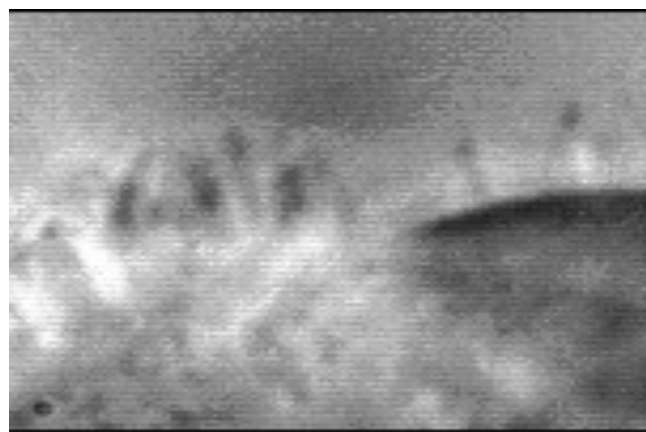
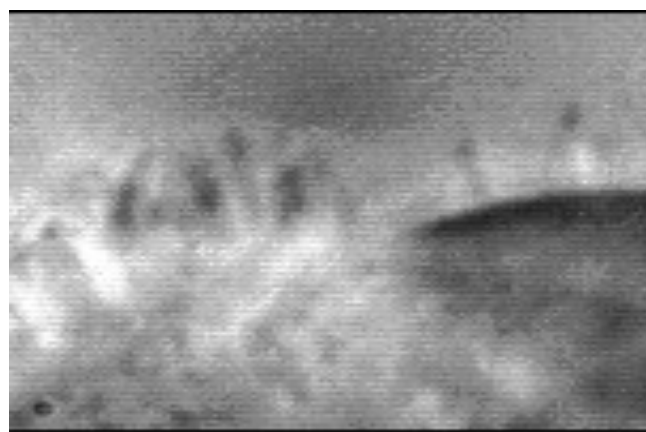
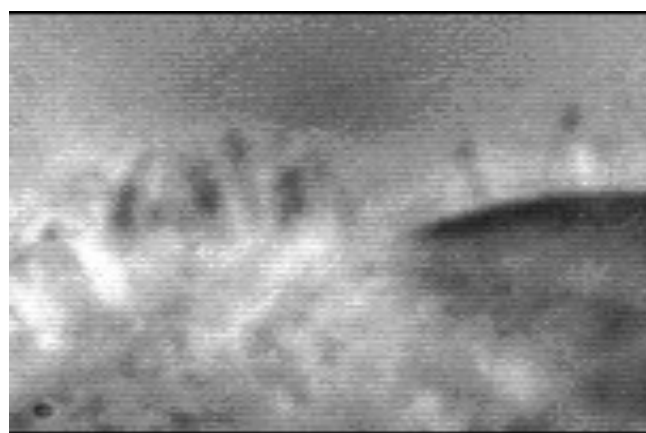
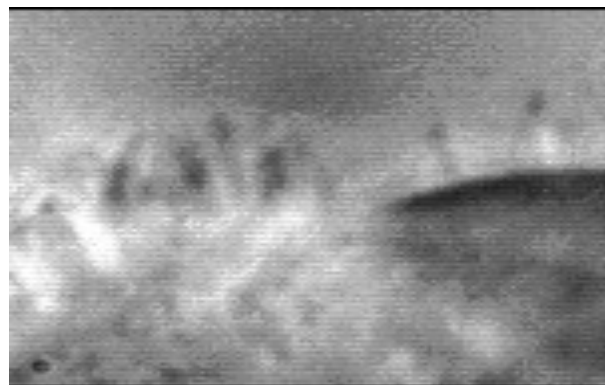
Est-il possible de rétablir un battement ciliaire normal et de guérir la maladie ?

Malheureusement, il n'est pas à ce jour possible de guérir la maladie en rétablissant un battement ciliaire normal chez les personnes atteintes. Toutefois, ce traitement est envisageable. Il est le seul qui permettrait le rétablissement d'un drainage normal des voies respiratoires et donc une diminution nette des infections respiratoires et un arrêt des dégradations des bronches.

Est-ce que des tentatives ont déjà été faites ?

Oui. L'équipe du Dr Bouvagnet a réalisé la première étape que l'on appelle « la preuve du concept ». Ce travail a porté sur le gène *DNAIL1*, le premier à avoir été impliqué dans cette maladie mais la démonstration vaut pour les autres gènes. Les personnes atteintes de DCP à cause de mutations dans le gène *DNAIL1* ont les 2 copies de ce gène avec une mutation. Aucune protéine DNAIL1 fabriquée à partir de ces 2 copies n'est normale. Cependant, les parents qui sont porteurs tous les 2 d'une copie *DNAIL1* avec une mutation et une copie *DNAIL1* normale ne souffrent pas de DCP et n'en souffriront jamais. On peut donc imaginer que si on apportait une copie supplémentaire normale du gène *DNAIL1* aux cellules ciliées du malade, on pourrait rétablir un battement ciliaire normal de ces cellules ayant 2 copies anormales natives du gène et une copie normale. Faire cette démonstration, c'est faire la « preuve du concept ». Pour cela, l'équipe du Dr Bouvagnet et des équipes collaboratrices ont utilisé un lentivirus dans lequel a été introduit un gène *DNAIL1*. Les cellules épithéliales ciliées d'une personne atteinte de DCP secondaire à des mutations dans le gène *DNAIL1* ont été prélevées pour les besoins de cette expérience. Ces cellules ont été traitées par le gène médicament et alors que les cils de cette personne étaient spontanément totalement immobiles, les cellules traitées ont retrouvé un battement ciliaire apparemment normal. Cette étape est essentielle parce qu'elle montre qu'**en apportant à ces cellules malades une troisième copie (normale) du gène *DNAIL1*, on rétablit le battement des cils.** De même, si le défaut de battement ciliaire est secondaire à un autre gène (par exemple *DNAH5*), en apportant une 3^{ème} copie (normale) du gène *DNAH5* aux cellules déficientes, on devrait rétablir un battement ciliaire normal.

Il faut préciser que ce travail a été réalisé sur des cellules prélevées et c'est donc déroulé sur des cellules humaines en culture.



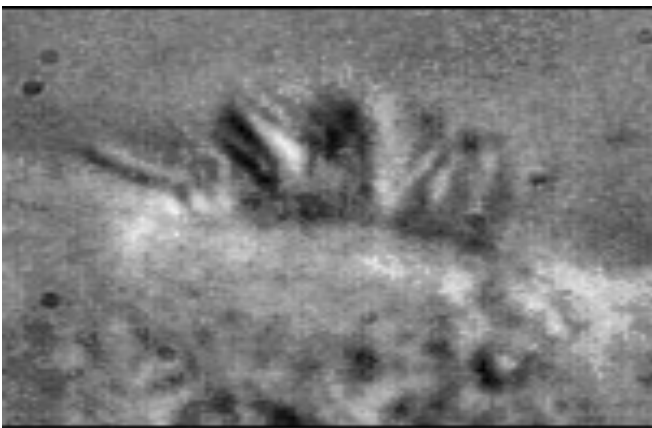
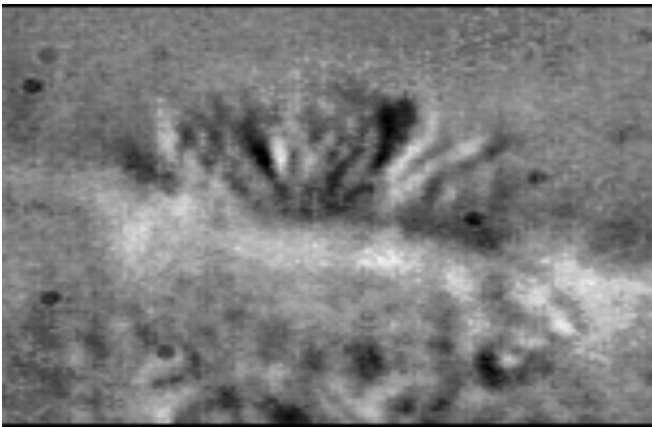
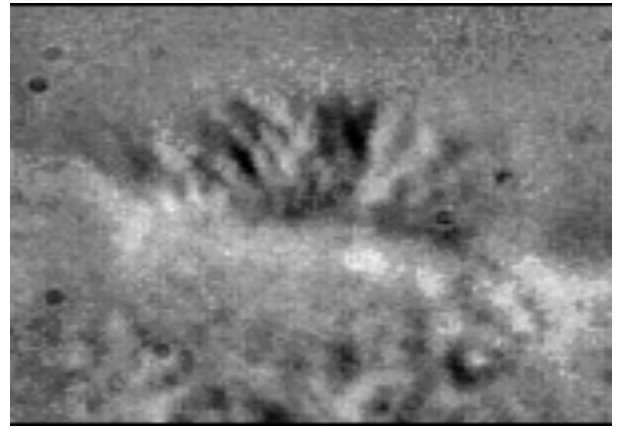
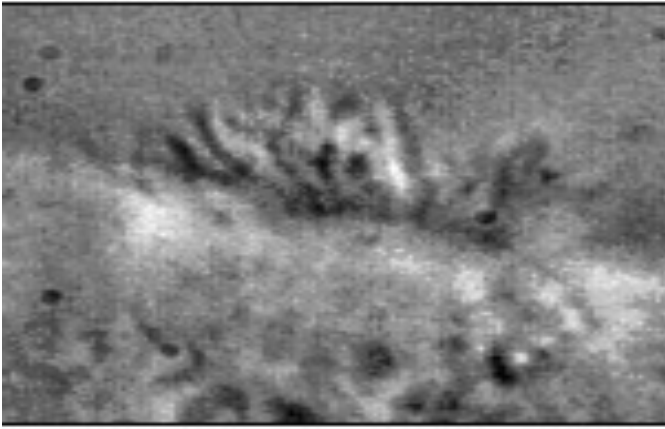


Figure 9 : Images tirées de vidéos. En haut, les cellules malades ont été traitées par un placebo. Les cils sont totalement immobiles. En bas, les cellules malades ont été traitées par le « gène médicament ». Les cils sont mobiles. La fréquence de leur battement est normale (12 battements par seconde !).

Quelles sont les prochaines étapes ?

Les 3 étapes principales en thérapie génique sont :
1) la « preuve du concept » que nous venons de voir. 2) thérapie génique in vivo sur un animal, c'est-à-dire traitement d'un animal malade et 3) thérapie génique chez l'homme.

En dehors de la démonstration de « la preuve du concept » qu'avez-vous appris de cette première étape qui sera utile pour la suite ?

Cette expérience réussie mais aussi les travaux de nombreuses équipes dans le monde qui travaillent sur des projets de thérapie génique ont permis de mieux comprendre quelles sont les contraintes pour les prochaines étapes. En voici les principales :

- 1) nous voudrions que le vecteur qui contient le gène-médicament n'apporte ce gène-médicament qu'aux cellules épithéliales ciliées.
- 2) Nous voudrions que le gène-médicament soit le plus stable possible dans le temps afin de devoir répéter le traitement le moins souvent possible.
- 3) Nous voudrions que le gène-médicament ne soit actif que dans les cellules ciliées respiratoires de sorte que si le gène-médicament est transporté dans d'autres cellules par le vecteur, il ne soit pas actif donc pas toxique.
- 4) Nous voudrions que le vecteur puisse

accepter des gros gènes. En effet, *DNAI1* est un gène de taille moyenne, mais *DNAH5* qui est responsable d'environ 25% des cas de DCP est très gros. Il est donc important que le vecteur choisi puisse aussi transférer ce gros gène. Si nous savons transférer aussi des gros gènes, nous pourrions utiliser ce traitement pour tous les malades atteints de DCP.

Comment est envisagée la suite du travail ?

Les vecteurs non viraux comme les bicouches lipidiques peuvent accommoder de grands fragments d'ADN donc de grands gènes mais le taux de transfert dans les cellules est très faible et des résultats préliminaires réalisés chez la souris dans le cadre d'une recherche sur la mucoviscidose montre que ce système ne marche pas avec les cellules ciliées. Il faut donc utiliser un virus. Les seuls virus capables d'accueillir un grand fragment d'ADN donc un gros gène sont le virus de l'Herpès et le baculovirus. La capacité de ces 2 virus permet d'envisager de transférer un gène complet (la partie permettant la fabrication de la protéine et la partie régulant cette fabrication). Pour les gros gènes comme *DNAH5*, il serait possible de construire un « minigène » contenant les informations minimales (à déterminer) pour la synthèse contrôlée de la protéine dans la cellule ciliée. Avec ces 2 virus, on peut envisager de transférer tous les gènes responsables de la DCP avec leurs systèmes de régulation.

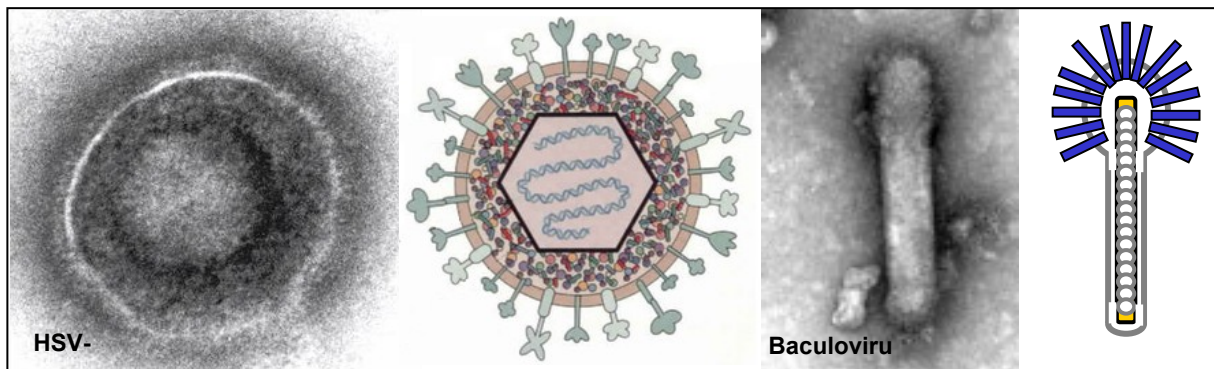


Figure 10 : le virus de l'herpès est présenté à gauche (HSV-1) vu avec un microscope électronique et sous forme de schéma. Le baculovirus est présenté à droite (Baculovirus) vu au microscope et sous forme de schéma. Images et photographies tirées de <http://www.wadsworth.org/divisions/infdis/virology/hsv.htm> et <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/AnimalViruses.html>.

Est-ce que ces virus (virus Herpès simplex et baculovirus) sont capables d'infecter les cellules épithéliales ciliées ?

Ceci n'est pas connu à ce jour. Une première étape consiste à tester ces virus sur des cellules épithéliales ciliées avec un gène « reporter ». Il s'agit par exemple du gène de la GFP (à la place du gène *DNAI1*) qui permet que la cellule fabrique une molécule verte visible au microscope avec de la lumière UV. Si les cellules épithéliales sont peu ou pas infectées, il sera possible d'améliorer l'infection des cellules épithéliales ciliées en pseudo typant les virus. Le pseudo typage consiste à changer en partie l'enveloppe du virus (sa « carrosserie »). On peut ainsi ajouter une protéine et certaines protéines sont connues pour conférer une bonne infectivité des virus pour les cellules épithéliales ciliées. Il faudra, bien sûr, vérifier si d'autres cellules de l'organisme sont infectées et si le gène-médicament est bien actif que dans les cellules ciliées.

Quelle sera la durée de l'expression du gène-médicament ?

Il faudrait idéalement que les cellules infectées expriment de manière permanente le gène-médicament. Cependant, cela est difficile parce que les cellules épithéliales ciliées sont en renouvellement permanent. Il faudra donc renouveler le traitement régulièrement. De plus, l'ADN du gène médicament peut être instable et détruit par la cellule. La stabilité du gène-médicament est meilleure dans le cas du virus de l'Herpès car le virus est suffisamment grand pour accommoder un mini chromosome. Ce mini chromosome semble aussi stable qu'un chromosome normal de la cellule. De plus, il est dupliqué comme les autres chromosomes lorsque la cellule se divise.

Le gène-médicament ainsi apporté risque-t-il d'intégrer un chromosome ?

En effet, la raison pour laquelle un lentivirus ne peut pas être utilisé est que le lentivirus permet une intégration du gène médicament quelque part dans un chromosome de la cellule épithéliale ciliée. Cette intégration assure la pérennité de la présence du gène-médicament dans cette cellule même si celle-ci se divise. Cependant, l'emplacement de l'intégration du gène-médicament n'est pas contrôlable. Ainsi, il est possible qu'un gène-médicament s'intègre au milieu d'un gène important et induise des modifications dangereuses comme une cancérisation de cette cellule. Dans le cas du baculovirus et du virus de l'Herpès, il n'y a pas d'intégration donc pas de risque de cancérisation.

Quelle sera l'espèce animale utilisée pour cette 2^{ème} étape en vue d'une thérapie génique humaine ?

L'animal le plus généralement utilisé dans les projets de thérapie génique est la souris. Il est possible de reproduire la maladie humaine en introduisant de manière permanente une mutation dans un gène cible par exemple *DNAI1*. En croisant les souris, on peut obtenir des souris qui portent la mutation sur les 2 copies du gène *DNAI1*. Elles sont donc malades. Les souris parentales qui ont une copie *DNAI1* normale et une copie de *DNAI1* avec la mutation sont normales, comme chez l'homme. Cette souris existe déjà. Elle a été produite par un laboratoire

américain. Il sera peut-être possible de se la procurer. Une souris déficiente pour le gène *Dnah5* existe aussi mais elle meurt vers l'âge de 2 à 3 semaines du fait d'une hydrocéphalie (secondaire à la mutation dans le gène *Dnah5*). Obtenir un modèle de souris viable avec une mutation dans le gène *Dnah5* est important. En effet, du fait de sa taille et de son implication fréquente dans la DCP chez l'homme, ce gène est un modèle important pour préparer une thérapie génique. Il est possible d'obtenir une souris génétiquement modifiée en payant le service dans une « clinique » comme la « clinique de la souris » à Strasbourg. D'autres gènes ont été impliqués dans de rares cas de DCP (*DNAH11*, *DNAI2*, *KTU*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *TXNDC3*, *RPGR*, *LRRC50*). Des souris déficientes dans un de ces gènes sont peut-être déjà disponibles.

Comment pourrez-vous déterminer quand l'étape 2 sera réussie permettant de passer à l'étape 3 de thérapie génique humaine ?

Nous pourrions tester chez ces souris malades l'efficacité du traitement en observant le battement des cils avant traitement et après traitement. Il sera possible d'observer si des anomalies apparaissent dans d'autres organes du fait du traitement. Il sera possible d'observer la durabilité du traitement dans le temps. Il sera aussi possible de répéter ces traitements pour observer la réponse immunitaire de la souris contre les virus utilisés. Ces évaluations sont indispensables mais une souris n'est pas un homme et il restera beaucoup d'inconnus lorsque nous envisagerons la 3^{ème} étape chez l'homme.

Quel est le budget nécessaire pour réaliser ce 2^{ème} pas vers la thérapie génique humaine ?

Le premier pas (« preuve du concept ») a nécessité le travail d'une doctorante pendant 4 ans. La réalisation du 2^{ème} pas correspond à peu près au même volume de travail. Le salaire d'un doctorant coûte environ 2900 Euros/mois (charges sociales comprises) soit 34 800 Euros/an. Le financement des expériences coûte environ 15 000 Euros/an. Le coût annuel de cette recherche est donc de 49 800 Euros/an. Il faut compter 3 ou 4 ans de recherche soit un budget de 150 000 à 200 000 Euros. La fabrication d'une souris déficiente pour le gène *Dnah5* coûte environ 20 000 Euros.