

3^{ème} Réunion de la Dyskinésie
Ciliaire Primitive (DCP)
Reims 6 octobre 2012

Essai de thérapie génique dans la
DCP

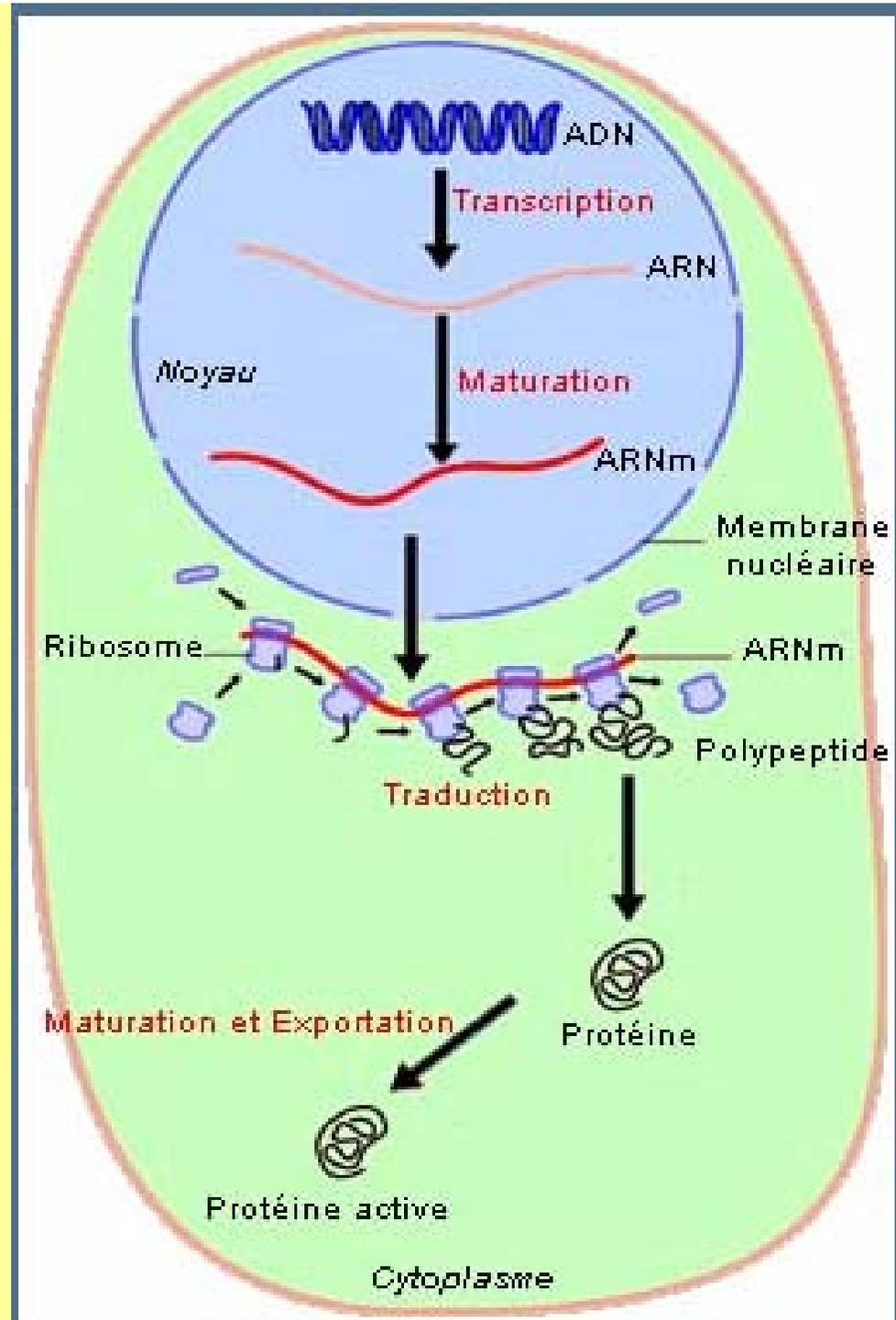
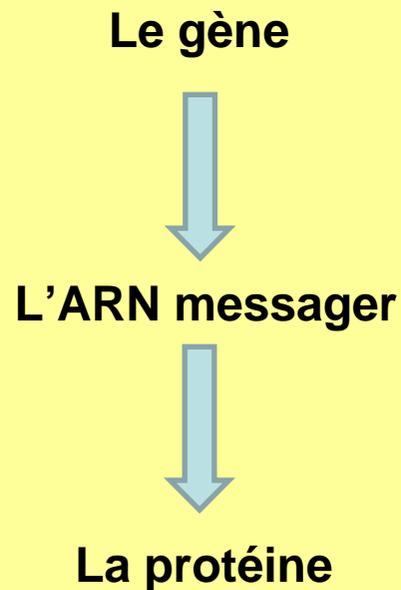


La DCP est une maladie génétique

- Nous avons 23 000 gènes en 2 copies :
 - 1 copie d'origine paternelle
 - 1 copie d'origine maternelle46 000 copies de gènes
- Chacun de nous a 150-200 mutations (~1% des gènes)
- Une DCP apparaît si les 2 copies d'un gène sont mutées

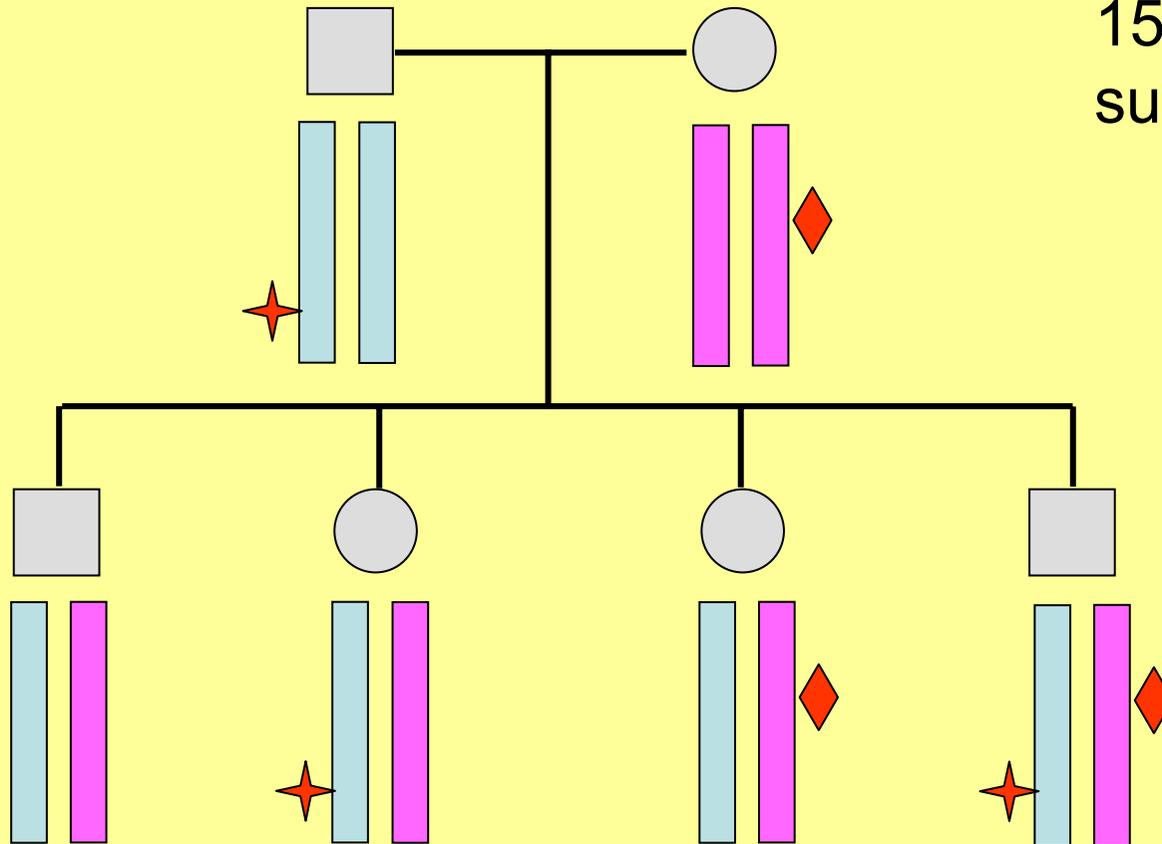
Du gène à la protéine

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



DCP : Transmission autosomique récessive

150-200 mutations
sur les 23 000 gènes



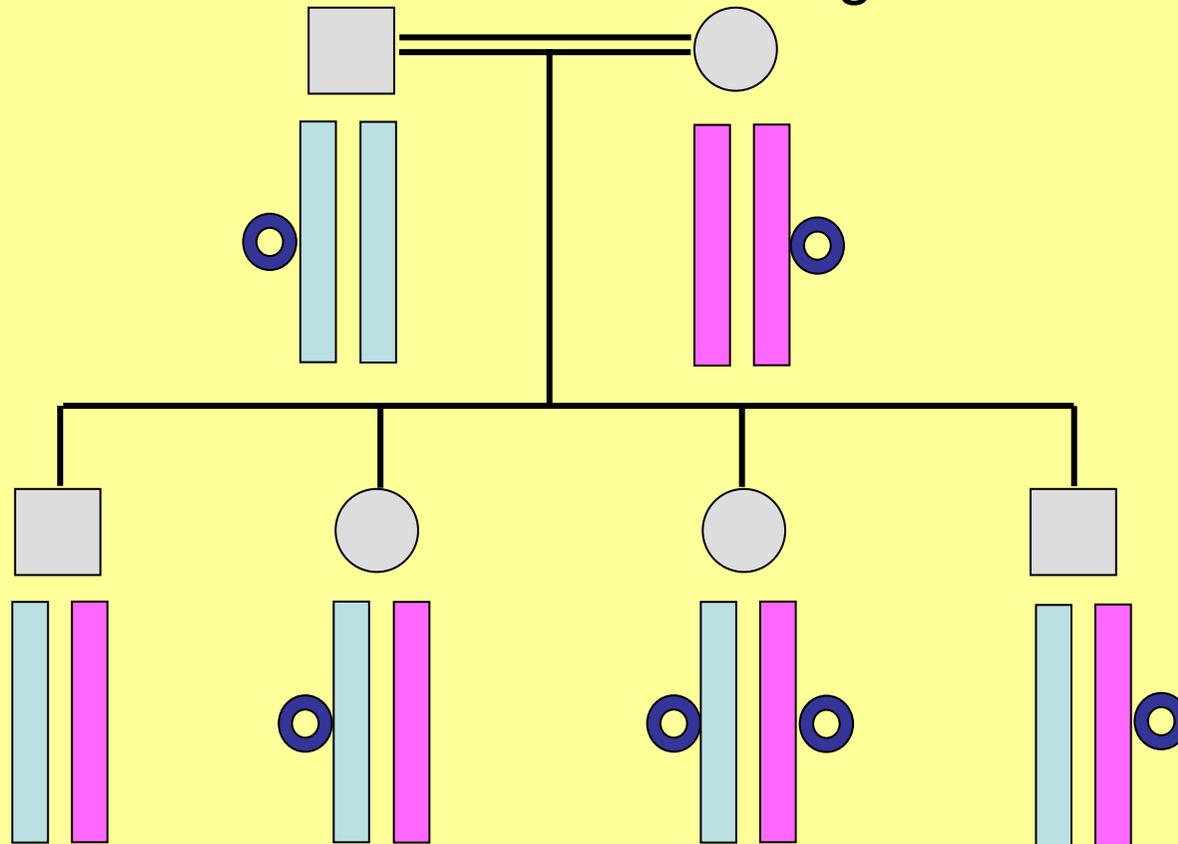
$\frac{1}{4}$ des enfants

DCP et consanguinité

Mariages :

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

Cousins germains : $1/16$ gènes communs



$1/4$ des enfants

Thérapie génique : 3 étapes

1) Preuve du concept :



2) Thérapie génique in vivo chez un animal (souris)

3) Thérapie génique in vivo chez l'homme

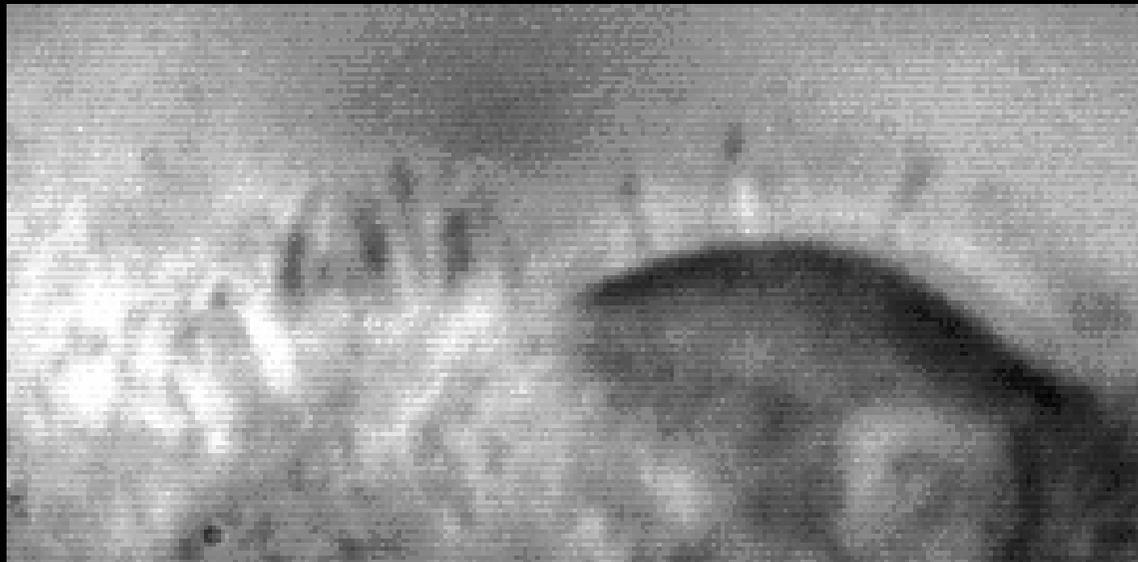
Etapes de thérapie génique

- 1) Transporter le gène médicament dans la cellule jusqu'au noyau
- 2) Le gène médicament doit être transcrit (fabrication d'ARN)
- 3) L'ARN doit être traduit (fabrication de protéine)
- 4) La protéine doit fonctionner donc le cil battre à nouveau !

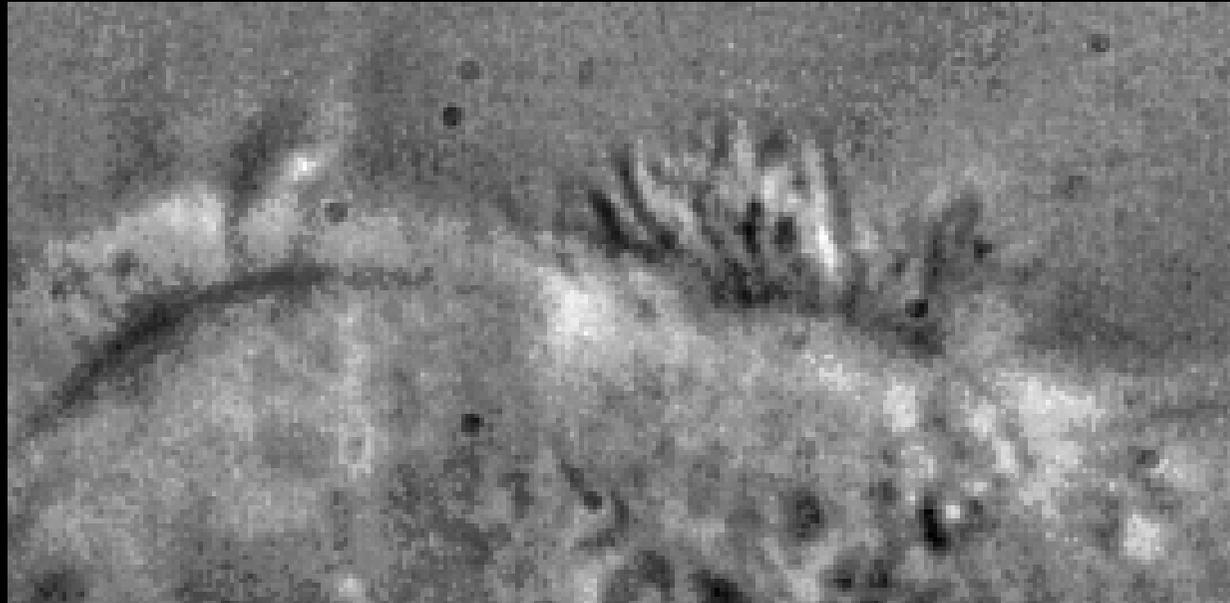
Preuve du concept : gène *DNAI1*, vecteur : rétrovirus

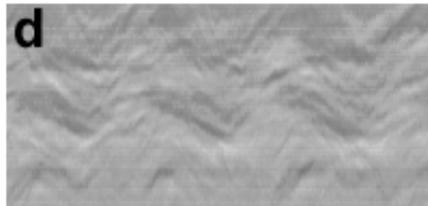
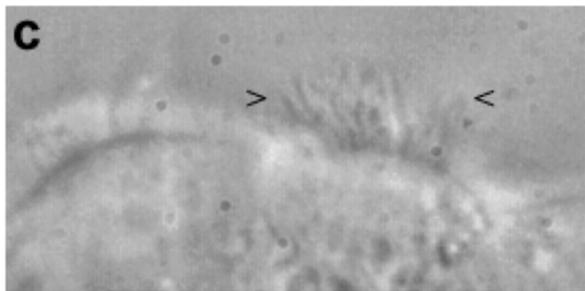
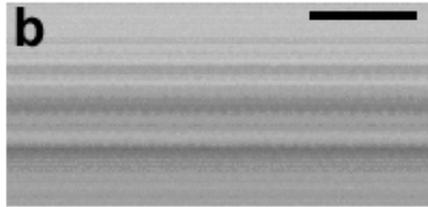
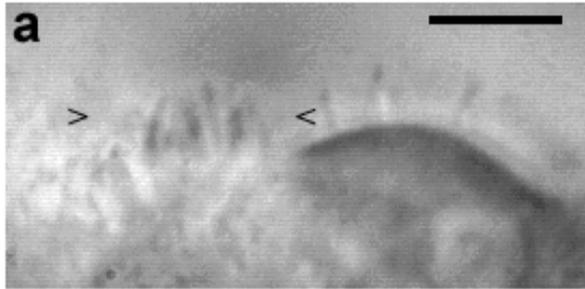
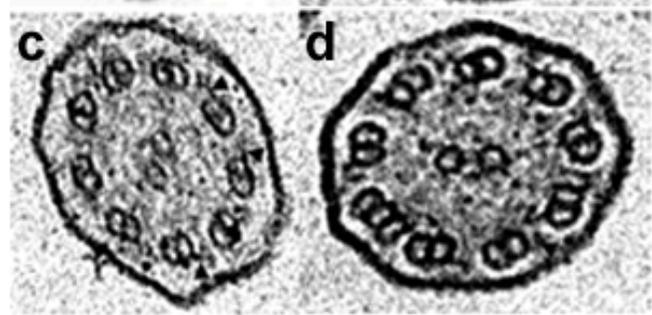
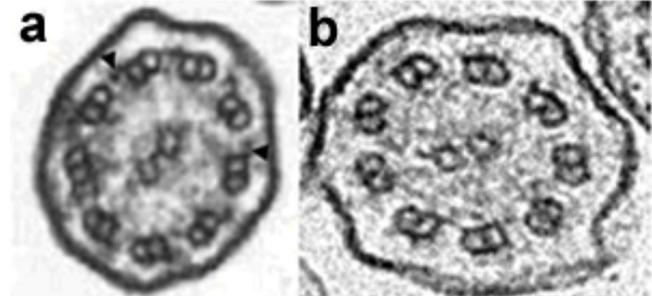
- Il faut obtenir des cellules ciliées humaines déficientes pour le gène *DNAI1*
- Il faut prélever 2 fragments :
 - 1 fragment contrôle (rétrovirus + gène *GFP*)
 - 1 fragment pour être « traiter » (rétrovirus + gène *DNAI1*)

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 : étape 1

- Démonstration de la
« preuve du concept »

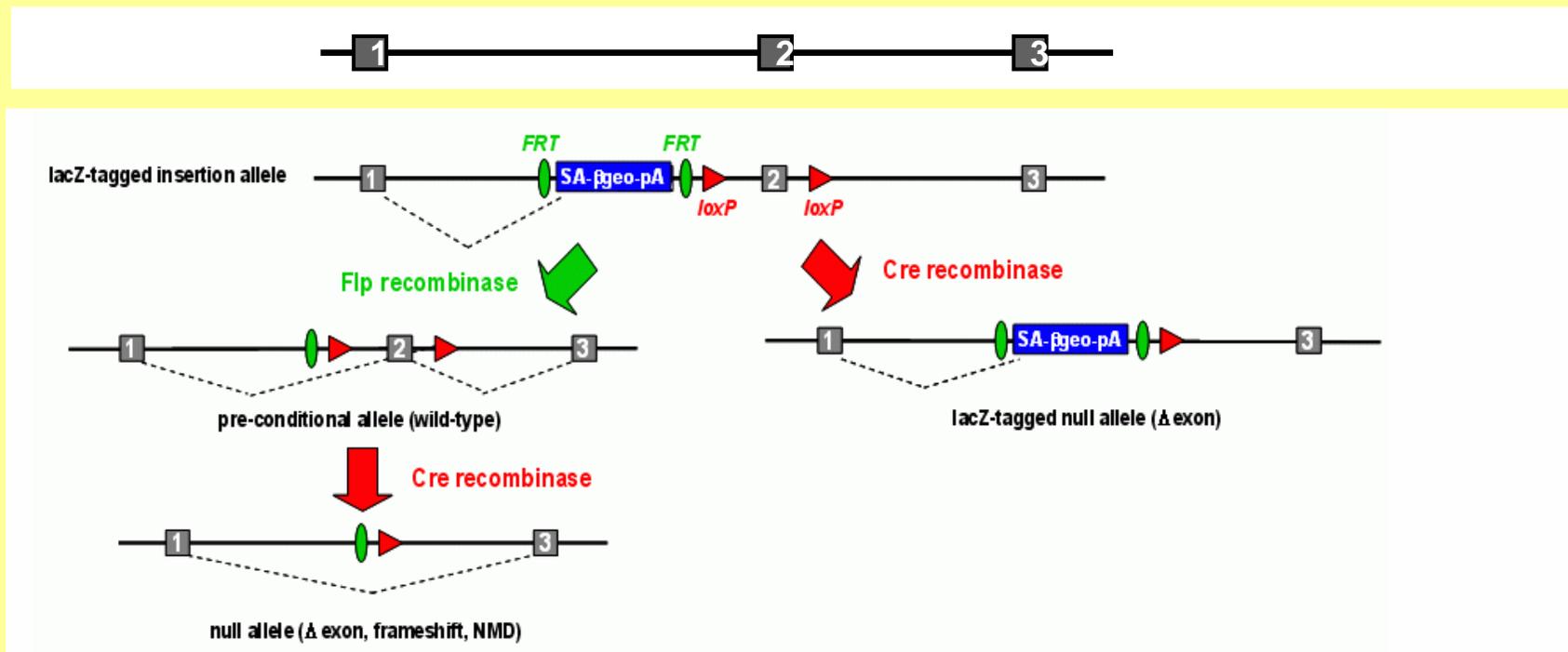


Etape 2 : thérapie génique *in vivo* chez une souris

- Modèle animal : souris KO spontané ou provoqué
 - Dnaic1 : KO conditionnel : pas disponible
 - Dnahc5 : 2 modèles, cils immobiles, absence bras externes de dynéine
 - Mais, mortalité : malformations cardiaques, hydrocéphalie
- Fabrication d'un modèle !

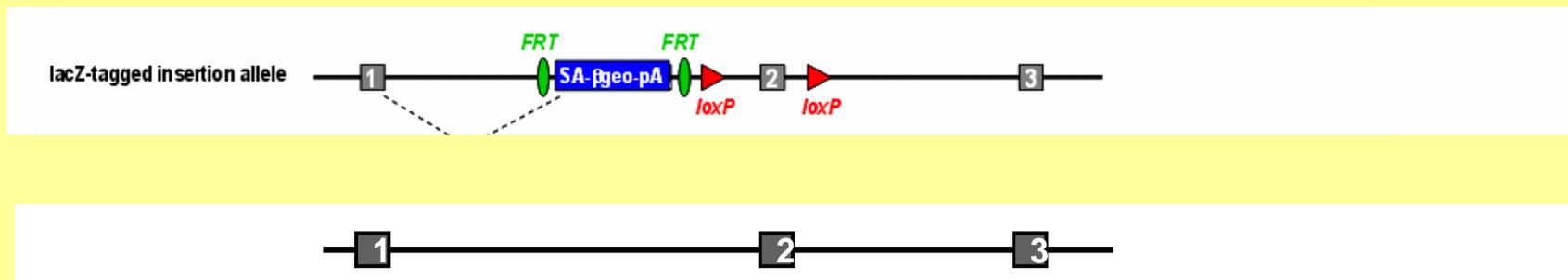
Modèle de souris : KO conditionnel *Dnahc5*

- Institut Clinique de la Souris (Strasbourg) : 33 000 Euros
- 1) Modification du gène cible dans un tube



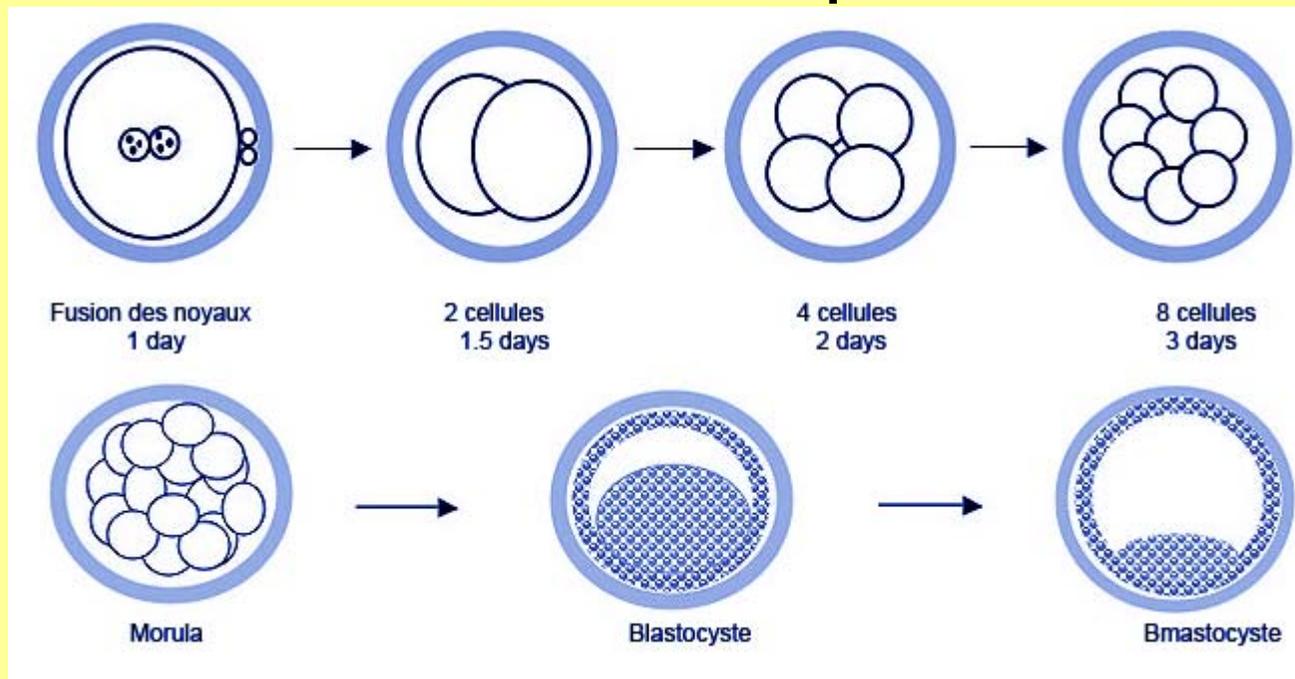
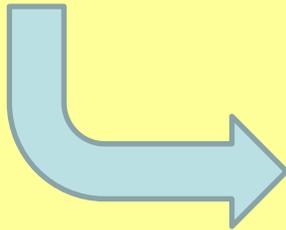
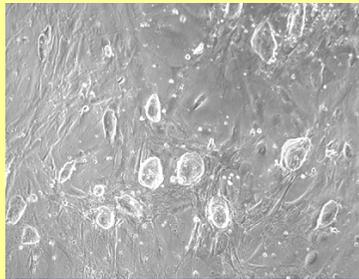
Modèle de souris : KO conditionnel *Dnahc5*

- 2) Obtention de cellules ES recombinantes
 - Cellules ES : Embryonic stem cells
 - Cellules recombinantes



Modèle de souris : KO conditionnel *Dnahc5*

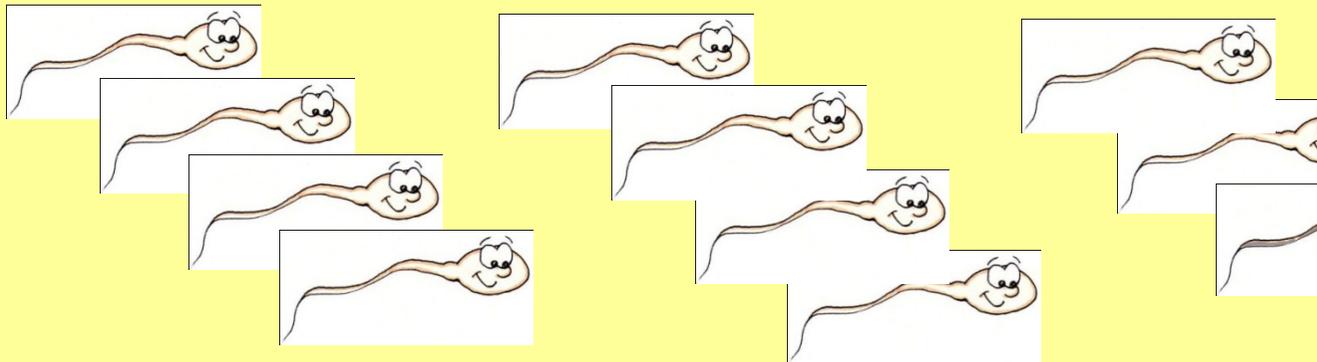
- 3) Obtention de souris chimériques



Modèle de souris : KO conditionnel *Dnahc5*

Cellules ES : poil noir

Morula : poil blanc

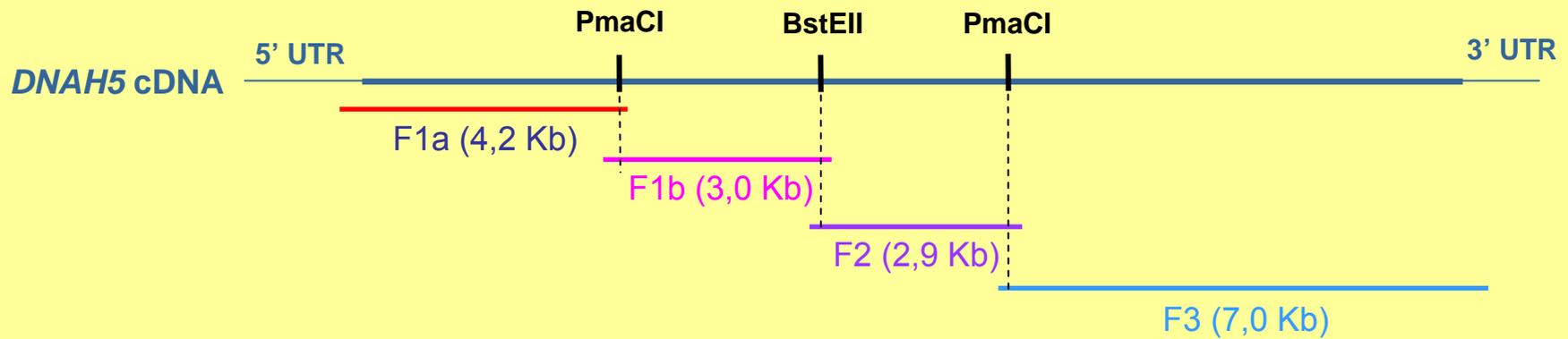


Modèle de souris : Alternative : souris SI/Col

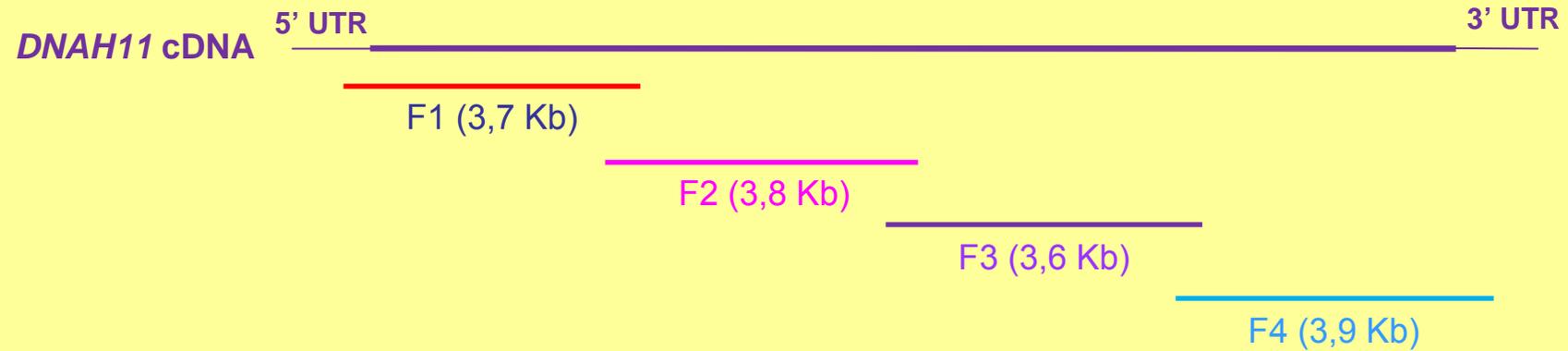
- Jackson laboratory (Maine, USA) : Katherine Hummel (1956)
- Mutation spontanée sur chromosome 12 (1992)
- Mutation dans gène *Ird*, *Dnahc11* (1997)
- Mutations *DNAH11* ~10% des DCP humaines : ME (normal), fréquence battement (normal)
- Souris SI/Col : ME (normal), immobilité ciliaire

Cloner le gène : *DNAH5*

➤ cDNA *DNAH5* : 15,6 kb

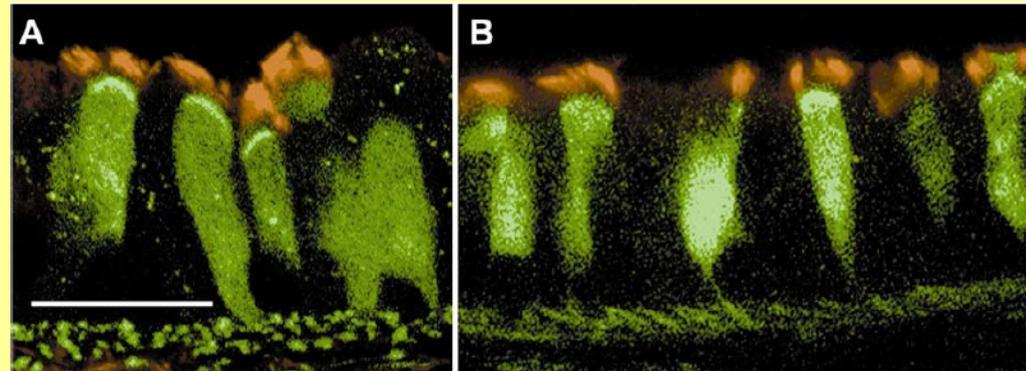


Cloner le gène : *DNAH11*



Contrôler le gène: Promoteur *FoxJ1*

- Gène *FOXJ1*: Facteur de transcription contrôlant le différenciation de cils motiles et l'asymétrie D/G chez la souris
- Souris transgéniques **pFOXJ1::EGFP**: Ostrowski L.E. *et al.*, *Molecular Therapy* 2003
 - Expression dans les cellules ciliées → trachée, bronches et cavités nasales
 - Pas d'expression dans les muscles et l'oesophage



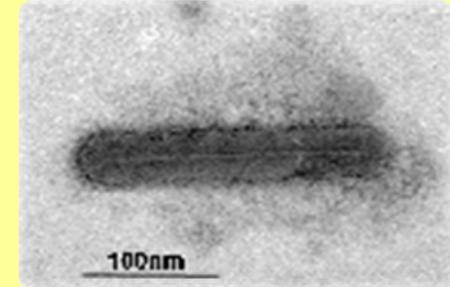
Tubuline β IV
EGFP

**LE PROMOTEUR FOXJ1 EST CAPABLE DE RESTREINDRE
L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE AUX CELLULES CILIÉES**

Le vecteur : une enveloppe virale

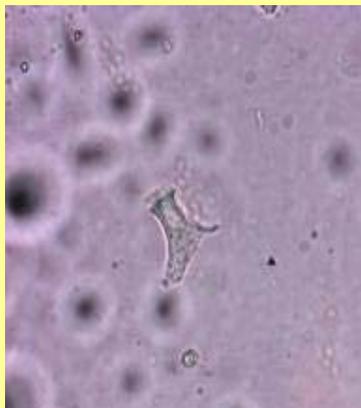
➤ Baculovirus (BacV) :

- *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus
- Virus d'insectes : génome ADNdb
 - ✓ Transgène de plus de 10kb
 - ✓ Non répliatif (biosécurité)
 - ✓ Large éventail de cellules de mammifère



➤ Baculovirus possédant l'ADNc de la tubuline fusionnée à la RFP

Cellules humaines



DAPI



RFP

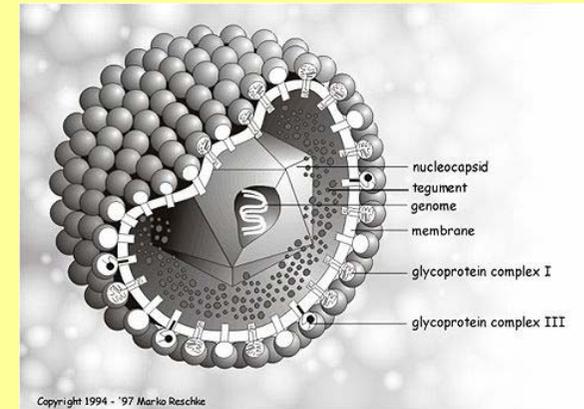


Merge

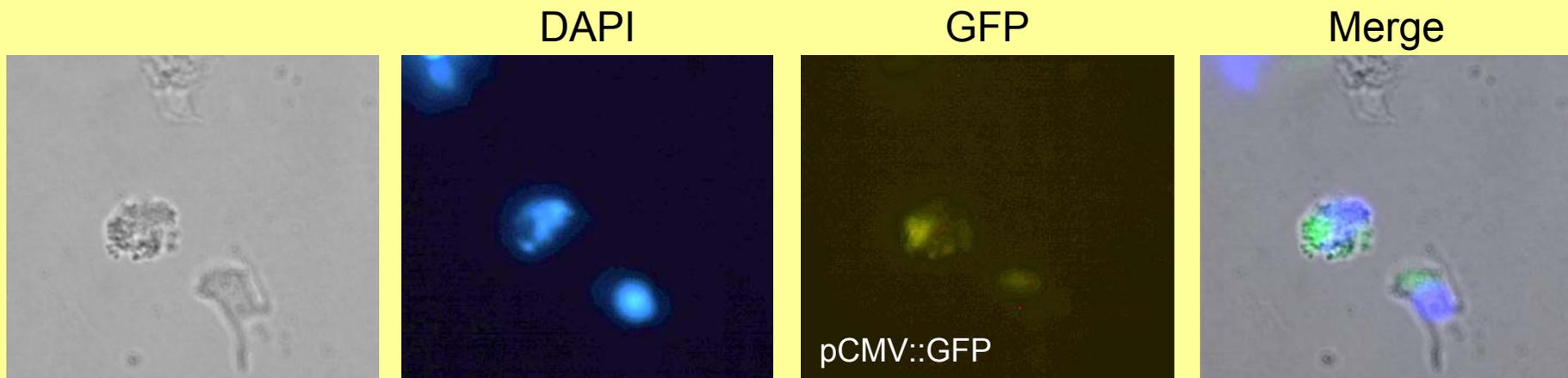


Le vecteur : une enveloppe virale

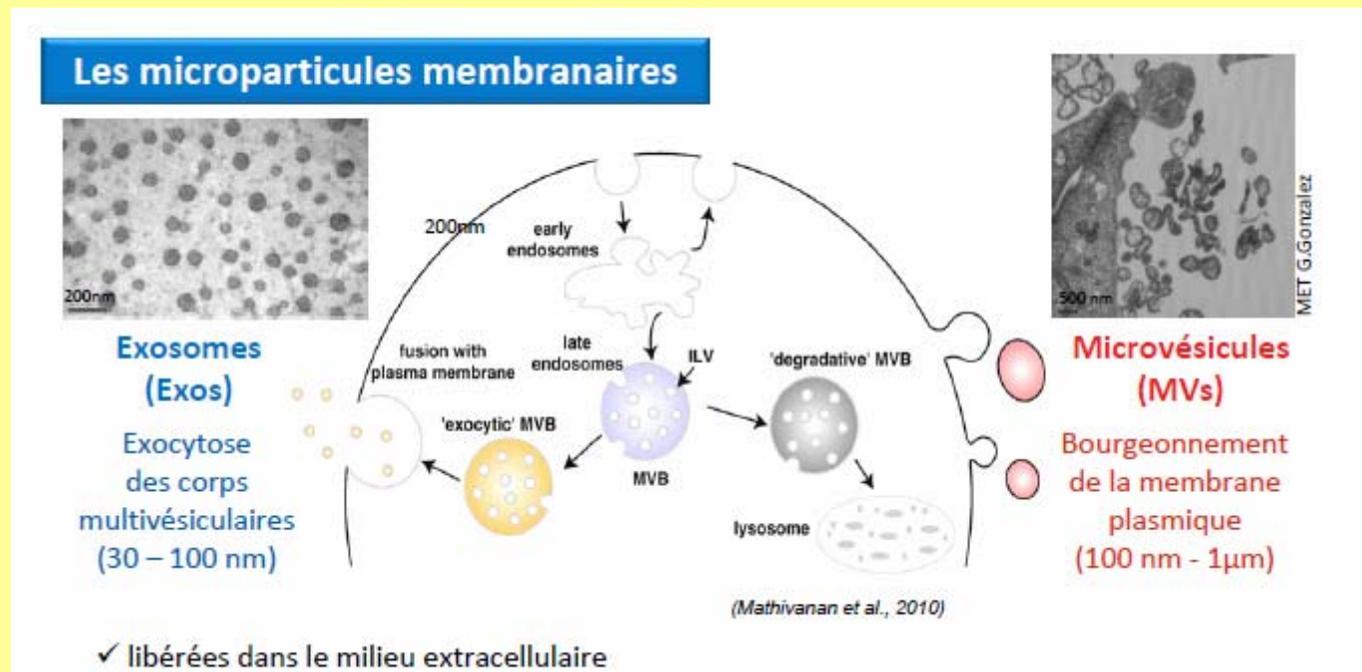
- Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1)
 - Utilisation de vecteurs amplicon : Génome viral remplacé par un plasmide amplicon
 - ✓ Capacité de 150kb
 - ✓ Non intégratif et défectif (biosécurité)
 - ✓ Large spectre d'hôtes et de tissus



Cellules murines



Le vecteur : une enveloppe cellulaire

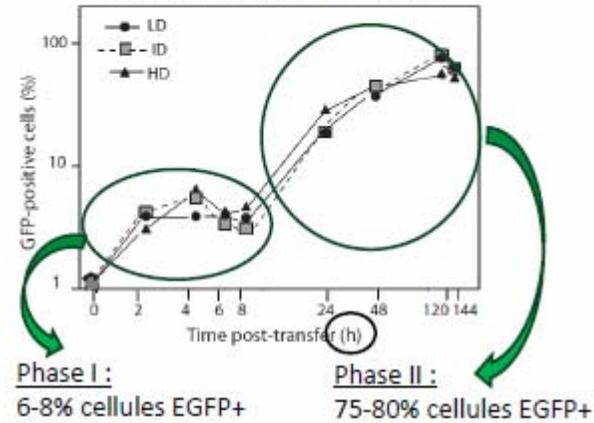


Les microparticules membranaires :

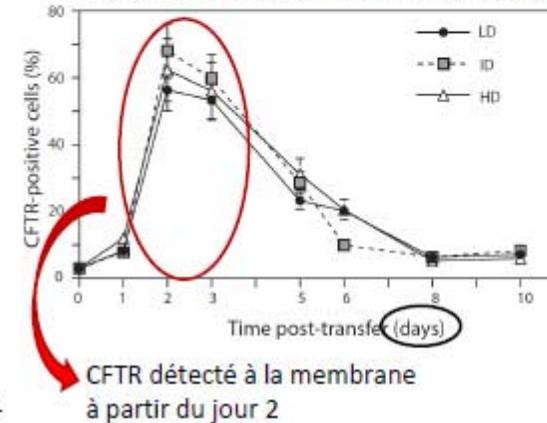
- sont produites spontanément par les cellules
- contiennent des protéines et des ARNs

Caractérisation des cellules cibles

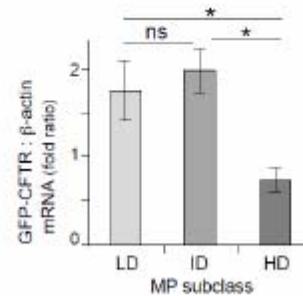
Fluorescence de l'EGFP (FACS)



Réactivité à l'anticorps anti-CFTR (FACS)



Détection d'ARNm egfp-cftr (J+3 pt) (qRT-PCR)



- Temps précoces :
protéine EGFP-CFTR transférée
- Temps tardifs :
protéine EGFP-CFTR néosynthétisée à partir de l'ARNm transféré

70 – 80% des cellules cibles expriment la protéine CFTR

En résumé

- Modèle souris :
 - *Dnahc5* conditionnel
 - *Dnahc11*
- Obtenir (cloner) le gène :
 - *DNAH5* assemblage
 - *DNAH11* correction des séquences
- Contrôle du gène :
 - Promoteur *FOXJ1* : obtenu
- Vecteurs :
 - Baculovirus : prêt
 - Herpers virus : prêt

- Pr P. Boulanger, Saw-See Hong, Cyrielle Vituret : UMR A754 INRA/Univ Lyon 1
- Alberto Epstein : vecteur dérivé du virus de l'herpès UMR 5534 CNRS/Univ. Lyon 1

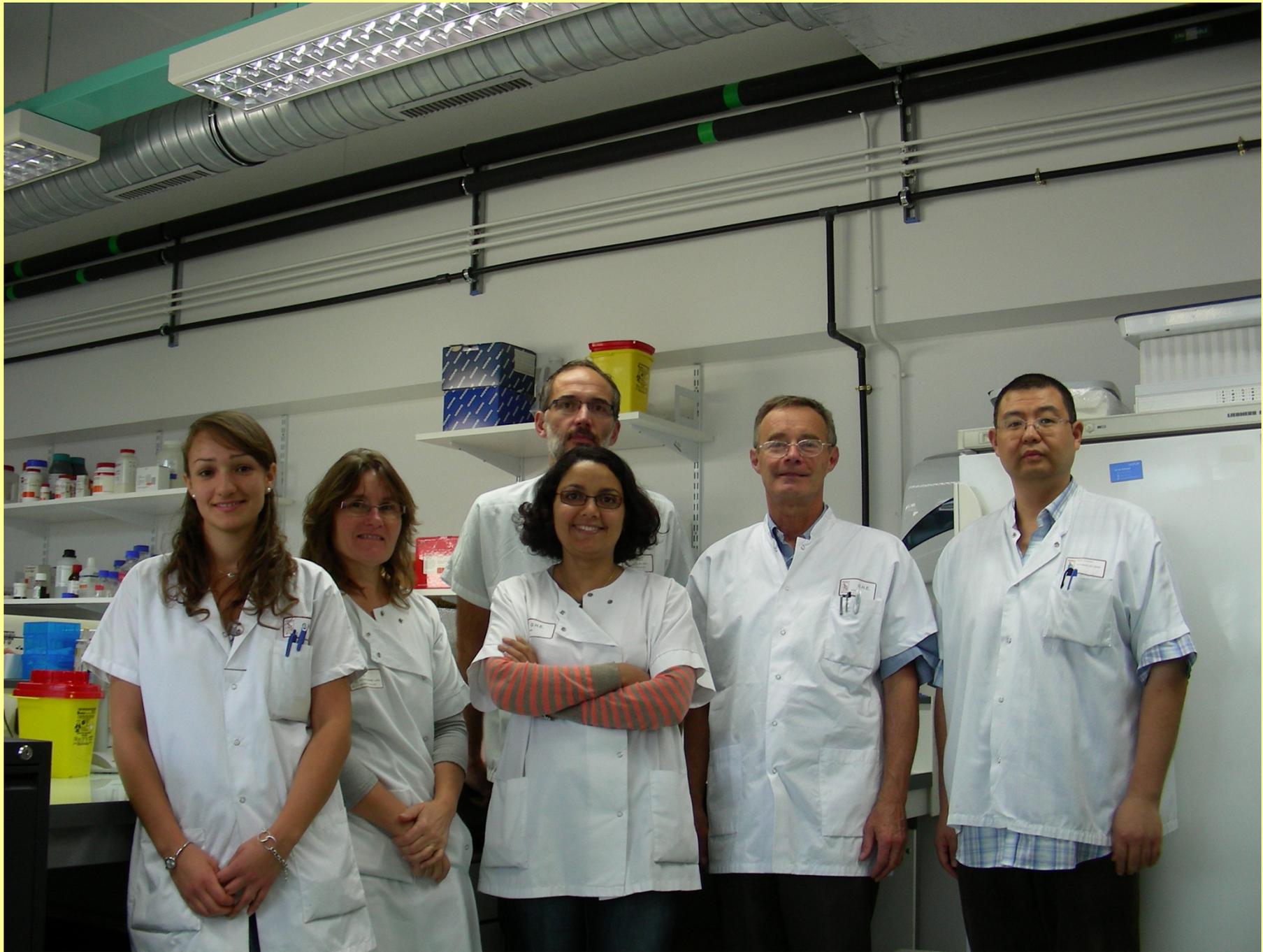


Université Claude Bernard Lyon 1



Hôpitaux de Lyon

**MERCI DE VOTRE
SOUTIEN !**



Remerciements

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

Knockout-first allele: Promoter-driven selection cassette

