



Compte rendu du 3^e congrès annuel de la société française de thérapie cellulaire et génétique

28 et 29 juin 2004, Paris, Groupe Hospitalier Necker - Enfants Malades.

Compte Rendu rédigé par :

- Susan Cure, PhD
- Nathalie Loux, PhD
- Thierry Toursel, PhD

AFM, Direction du développement des Thérapeutiques

1. Vectorologie

Etablissement de lignées cellulaires stables d'encapsidation pour la production d'Adéno-Associated Virus hybrides de sérotypes-1 et -5 **P.Moullier**

Développement de lignées cellulaires stables d'encapsidation appelées HeRC32. Ces cellules contiennent, intégrés de façon stable dans leur génome, les gènes *rep-cap* de l'AAV-2. Cette lignée cellulaire transfectée par un plasmide vecteur et infectée par un virus auxiliaire, assemble efficacement des particules AAVr. Cette capacité d'assemblage est corrélée avec l'amplification des gènes *rep-cap* intégrés, conduisant à un niveau élevé de synthèse des protéines *Rep et Cap*.

Par contre, une autre lignée cellulaire ayant intégré de façon stable dans son génome les gènes *rep-cap* de l'AAV-5 ne montre pas cette amplification.

Plusieurs lignées cellulaires stables d'encapsidation dans lesquelles une partie ou tout le gène *rep* de l'AAV-2 est fusionné au gène *cap* de l'AAV-1 ou de l'AAV-5 ont été établies. Les génomes des différentes lignées cellulaires hybrides sont amplifiées à la suite d'une infection adénovirale, et permettent la production de d'AAVr hybrides avec un rendement élevé.

Expression efficace d'un transgène dans le système nerveux central par un vecteur lentiviral non intégratif

J.Mallet

Développement d'un vecteur lentiviral dérivé du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 dépourvu de sa fonction d'intégration. Après transduction d'une cellule, le génome du vecteur persiste sous forme circulaire épisomale dans le noyau et permet néanmoins l'expression efficace et stable du transgène *in vitro* et *in vivo*. Le phénotype épisomal des particules a été induit par l'introduction d'une mutation dans la région C terminale de la séquence codante de l'intégrase.

Ce vecteur est capable de transduire avec un gène reporteur (GFP) :

- des neurones quiescents dérivés de cultures primaires de cortex de rats pendant au moins 3 mois
- le striatum de souris pendant au moins 1 mois

Ce vecteur pourrait transporter jusqu'à 10 kb (i.e minidystrophine).

2. Recherche pré-clinique en thérapie cellulaire

The blood – muscle interface during regeneration of skeletal muscle

A.Harel- Bellan

Efficacité insuffisante des myoblastes à régénérer les muscles squelettiques après transplantation. D'où essais d'utiliser différentes sources de cellules sources pour la thérapie cellulaire. Récemment il a été montré chez la souris la capacité de cellules clonales dérivées de cellules souches hématopoïétiques (HSCs) à régénérer le muscle. Mise en évidence de l'importance et de la similitude de la voie Wnt dans l'hématopoïèse et la myogenèse.

Une deuxième partie a montrée le rôle d'un micro RNA non codant (miR181) dans la régulation des HSCs et l'hématopoïèse et, la différenciation et la régénération du muscle squelettique. L'expression de miR181 est diminuée dans les myoblastes en prolifération et augmentée durant la régénération. Le miR181 peut être inhibé par une stratégie antisens. Les cibles moléculaires de ce micro RNA sont en cours d'identification.

3. Recherche pré-clinique en thérapie génique

Correction of neurodegeneration in mouse and dog models of hurler disease (MPSI)

JM. Heard

Cette maladie rare est causée par le défaut de l'enzyme α -L- iduronidase (IDUA). Celle-ci peut être délivrée sous forme recombinante dans les organes périphériques, mais ne peut pas atteindre le système nerveux central.

La neurodégénération peut être prévenue chez la souris MPSI par injection dans le striatum d'un vecteur AAV codant pour l'IDUA. Le gène de l'IDUA persiste pendant au moins 29 semaines en utilisant un vecteur AAV (serotype 2 ou 5). Cependant la diffusion et l'activité de l'enzyme est plus importante avec l'utilisation d'un AAV-5. Chez la souris MPSI, une seule injection intracérébrale permet une correction du phénotype.

Une étude pré-clinique a été réalisée chez des chiens MPSI sous immunosuppresseur pour limiter la réaction à l'enzyme. Chez les chiens MPSI qui ont reçu une immunosuppression légère, l'activité de l'enzyme IDUA n'est pas détectée dans le cerveau et une réaction immunitaire est observée. En revanche, tous les chiens ayant reçu une immunosuppression plus forte, montrent une activité de l'enzyme dans 30 à 100% des hémisphères injectés. Cependant, la diffusion de l'enzyme est moins bonne que chez la souris.

Actuellement, les enfants traités avec l'enzyme recombinante développent des anticorps anti-IDUA sans que soient observés d'effets secondaires. Cela laisse supposer que l'on pourrait tolérer avec l'enzyme recombinante.

4. Développement clinique

Thérapie neuroprotectrice : Phase de développement pré-clinique

J. Sahel

José Sahel a présenté ses travaux publiés dans Nature Genetics de Juillet dernier, faisant état de l'identification d'une nouvelle protéine nécessaire à la survie de certains photorécepteurs : les cônes. Ces résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques pour les maladies liées à la dégénérescence de ces cellules.

Persistance de séquences d'origine plasmidique chez le macaque plusieurs mois après injection d'AAVr

P.Moullier et A.Salvetti.

Une analyse par PCR quantitative a permis de mettre en évidence la présence de séquences du gène de résistance à l'ampicilline plusieurs mois après injection d'un vecteur AAVr dans des cerveaux de souris, de chiens et de macaques, ainsi que dans des muscles de macaques. L'analyse des lots d'AAVr injectés chez ces animaux, qu'ils aient été produits par transfection transitoire ou à partir de lignées cellulaires productrices stables, montre qu'un certain nombre de particules contenant des séquences autres que le vecteur, en particulier des séquences plasmidiques, sont générées et viennent contaminer les lots d'AAVr produits (1-9% des cas).

Ces résultats ont une incidence sur la définition d'un mode de production d'AAVr optimal en termes de sécurité.

Vecteur lentiviraux pour la thérapie génique du syndrome de Wiskott Aldrich (WAS)

A.Galy

Le WAS est dû à la mutation du gène WAS localisé sur le chromosome X et codant pour une protéine du cytosquelette qui s'exprime exclusivement dans les cellules hématopoïétiques. La correction des cellules autologues est envisageable dans cette maladie grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour transduire les progéniteurs hématopoïétiques. Des vecteurs de grade clinique, dérivés du VIH, non répliquatifs, auto-inactivés, pseudotypés avec l'enveloppe VSG-G permettent d'induire l'expression de la protéine WASP dans diverses cellules hématopoïétiques humaines et murines. La transduction de progéniteurs hématopoïétiques de souris WASP knock-out (WKO) et leur transplantation dans des receveurs WKO létalement irradiés permet d'observer l'expression de la

protéine WASP à long terme (5 mois) chez la souris in vivo ainsi que la correction d'anomalies fonctionnelles.

Ces résultats montrent que :

- la protéine WASP humaine est biologiquement active chez la souris ;
- le degré de correction fonctionnelle dépend du nombre de copies de vecteur.

Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de ces vecteurs pour la thérapie génique.