« VIRUS RECOMBINANT ASSOCIÉS À L'ADÉNOVIRUS: DÉVELOPPEMENT DES PROCÉDÉS ET APPLICATION DU TRANSFERT DE GÈNE POUR LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE » PAR GABRIELLE DIAS FLORENCIO LEITE

Discipline : physiologie, physiopathologie Laboratoire : Handicap Neuromusculaire : Physiopathologie, Biothérapie et Pharmacologie appliquées – ENDICAP

Résumé

L'intérêt de l'utilisation des vecteurs viraux comme le Adeno-Associated Virus recombinant (rAAV) dans la recherche pour le traitement des maladies génétiques a conduit à une évolution rapide des méthodes de production d'AAV au cours des deux dernières décennies (Ayuso et al., 2010). Leur large biodisponibilité in vivo et leur efficacité à long terme dans les tissus postmitotiques en font de bons candidats pour de nombreuses applications de transfert de gènes. En plus, la spécificité du traitement peut être augmentée lorsque le sérotype correct est choisi pour cibler un tissu spécifique. Parmi les méthodes de production actuellement utilisées, la tri-transfection de cellules embryonnaires humaines rénales 293 (HEK293) reste la plus populaire pour l'échelle de recherche; Et la production de rAAV médiée par des baculovirus pour des échelles plus importantes. L'importance croissante des vecteurs viraux dans l'application pratique de la thérapie génique exige l'amélioration des processus de production, en particulier en ce qui concerne les rendements et la pureté du produit final. Mon travail au cours de ces quatre années a été axé sur deux points principaux: (1) améliorer les processus biotechnologiques employés dans la production de rAAV pour la recherche et les échelles d'étude préclinique et (2) tester in vitro et in vivo les applications pour le rAAV dans le l'édition de genome. L'édition de gènes médiée par des nucléases spécialement conçues offre de nouveaux espoirs pour le traitement de plusieurs maladies héréditaires monogéniques. Récemment découvert, le système CRISPR Cas9 (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats) fournit des outils importants nécessaires pour corriger les mutations par homologie. Notre modèle canonique est la souris mdx, un modèle animal naturel de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Les mutations DMD, qui conduisent à l'absence de protéine dystrophine, entraînent une myopathie progressive et fatale. Plusieurs stratégies, allant des stratégies pharmacologiques aux stratégies de saut-d'éxon, ont tenté de renverser le phénotype et ralentisser la progression de la maladie, mais les résultats ne sont pas encore satisfaisants. Ce nouvel et

puissant outil d'édition de génome peut être vectorisé par rAAV. Les résultats de la première partie ont été publiés en 2015 et 2016 et seront présentés sous la forme d'articles et pour la deuxième partie, je présenterai les résultats préliminaires et les perspectives du travail qui se poursuivra dans le laboratoire.

Abstract

The interest of recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) vectors for research and clinical purposes in the treatment of genetic diseases have led to the rapid evolution of methods for AAV production in the last two decades (Ayuso et al., 2010). Their broad in vivo biodistribution and long-term efficacy in postmitotic tissues make them good candidates for numerous gene transfer applications. In addition, the specificity of the treatment can be increased when the right serotype is chosen to target a specific tissue. Among the production methods currently in use, tri-transfection of human embryonic kidney 293 (HEK293) cells remains the most popular for research scale; and rAAV production mediated by baculoviruses for larger scales. The increasing importance of viral vectors in the practical application of gene therapy demands the improvement of production processes, especially when it concerns the yields and purity of the final product. My work during these four years was focused in two main points: (1) improve biotechnological processes employed in rAAV production for research and pre-clinical study scales and (2) test in vitro and in vivo the applications for rAAV in the field of genome editing. Gene-editing mediated by engineered nucleases offers new hopes for the treatment of several monogenic inherited diseases. Recently discovered, the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Cas9 system provides important tools needed to correct by homology-directed repair mutations. Our canonical model is the mdx mouse, a naturally occurring animal model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). DMD mutations, which lead to the absence of the protein dystrophin, results in a progressive and fatal myopathy. Several strategies, from pharmacological to exon-skipping strategies, have attempt to revert the phenotype and slow down the disease progress, however results are not yet satisfactory. This new and powerful genome editing tool can be vectorized by rAAV. Results for the first part were published in 2015 and 2016 and will be presented in the form of articles and for the second part I will present preliminary results and perspectives for the work that will be continued in the lab.

INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

M. Luis GARCIA, DR1, université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, FRANCE - Directeur de these

M. Rachid BENCHAOUIR, Chargé de recherche, SQY Therapeutics, FRANCE - CoDirecteur de these

M. Onnik AGBULUT, Professeur des universités, Université Pierre et Marie Curie, FRANCE - Rapporteur

M. Otto-Wilhelm MERTEN, Directeur de recherche, Université d'Evry - Généthon, FRANCE - Rapporteur

M. Javier PEREA, Professeur des universités, Universite Evry Val d'Essonne, FRANCE - Examinateur

M. Cyrille VAILLEND, Chargé de recherche, Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), FRANCE - Examinateur

Mme Véronique BLOUIN, Ingénieur de recherche, Université de Nantes, FRANCE - Examinateur

Contact : DSR - Service SFED : theses@uvsq.fr