

Développement de vecteurs lentiviraux régulables pour le transfert de gène dans le Système Nerveux Central

Lahouari AMAR

LGN - UMR 7091
sous la direction du Docteur Jacques MALLET

- **Le transfert de gène dans le SNC**
- **Les vecteurs lentiviraux**
 - caractéristiques
 - avantages et méthode de production
 - applications

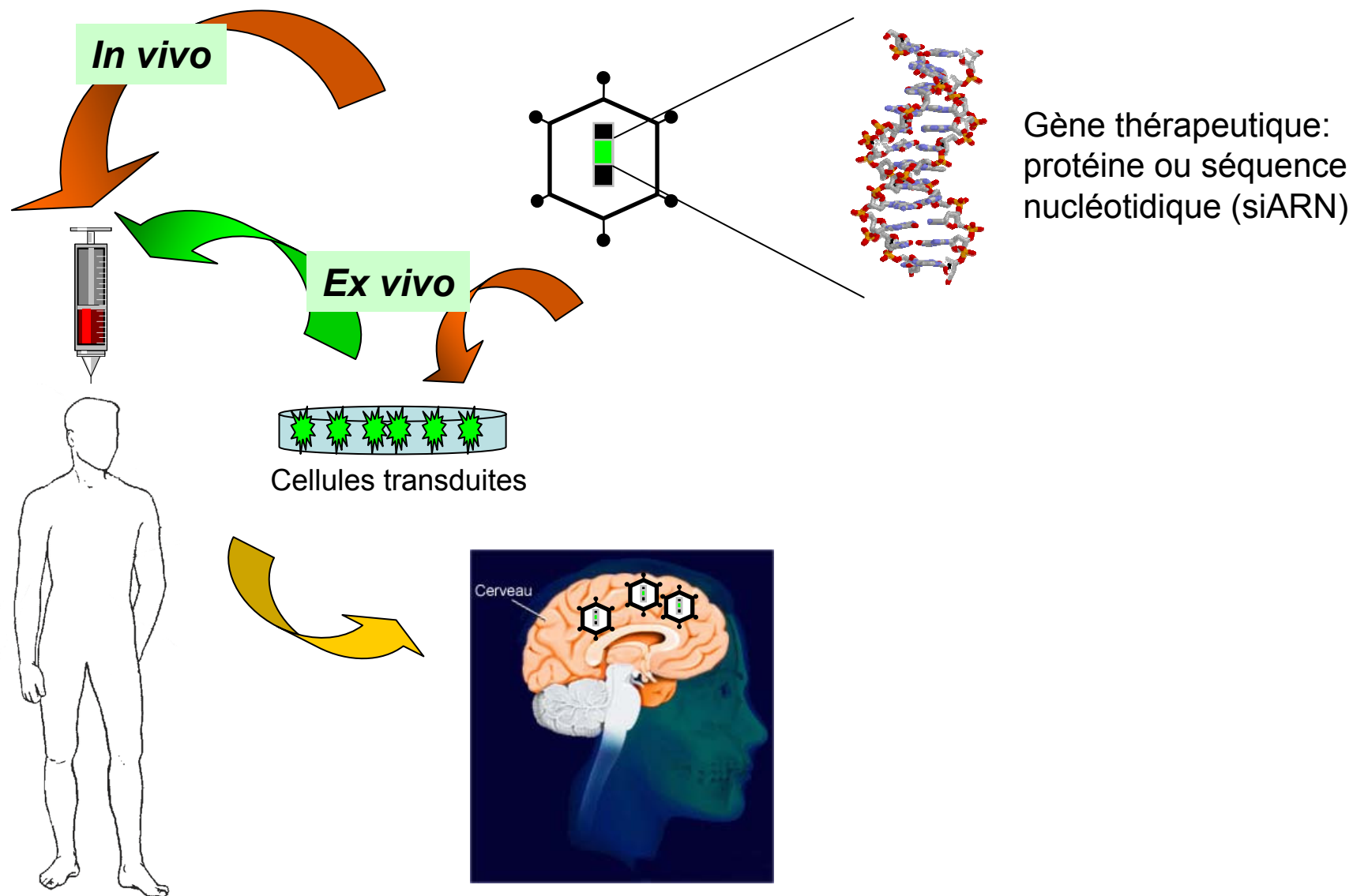
- **Résultats**

Développement d'un seul vecteur lentiviral pour:

- 1) l'expression régulée d'un facteur protéique
- 2) l'expression régulée de shARN

- **Conclusion générale et perspectives**

Transfert de gène dans le SNC



Spécificités du système nerveux central relatives au transfert de gène

- Présence de la barrière hématoencéphalique
 - Limite le passage de molécules thérapeutiques
 - » **Nécessité du transfert de gène...**
- La majorité des cellules du SN sont quiescentes
 - Possibilité d'utilisation de vecteurs intégratifs ou épisomaux
 - Vecteurs non viraux peu efficaces à long terme
 - » **préférentiellement viral...**
- Diversité cellulaire
 - Nécessité d'expression restreinte ou élargie du facteur thérapeutique
 - Possibilité de ciblage d'une structure ou noyau particulier dans le SN
 - Transport rétrograde ou antérograde dans les neurones
 - » **avec un vecteur dont le tropisme est modulable.**

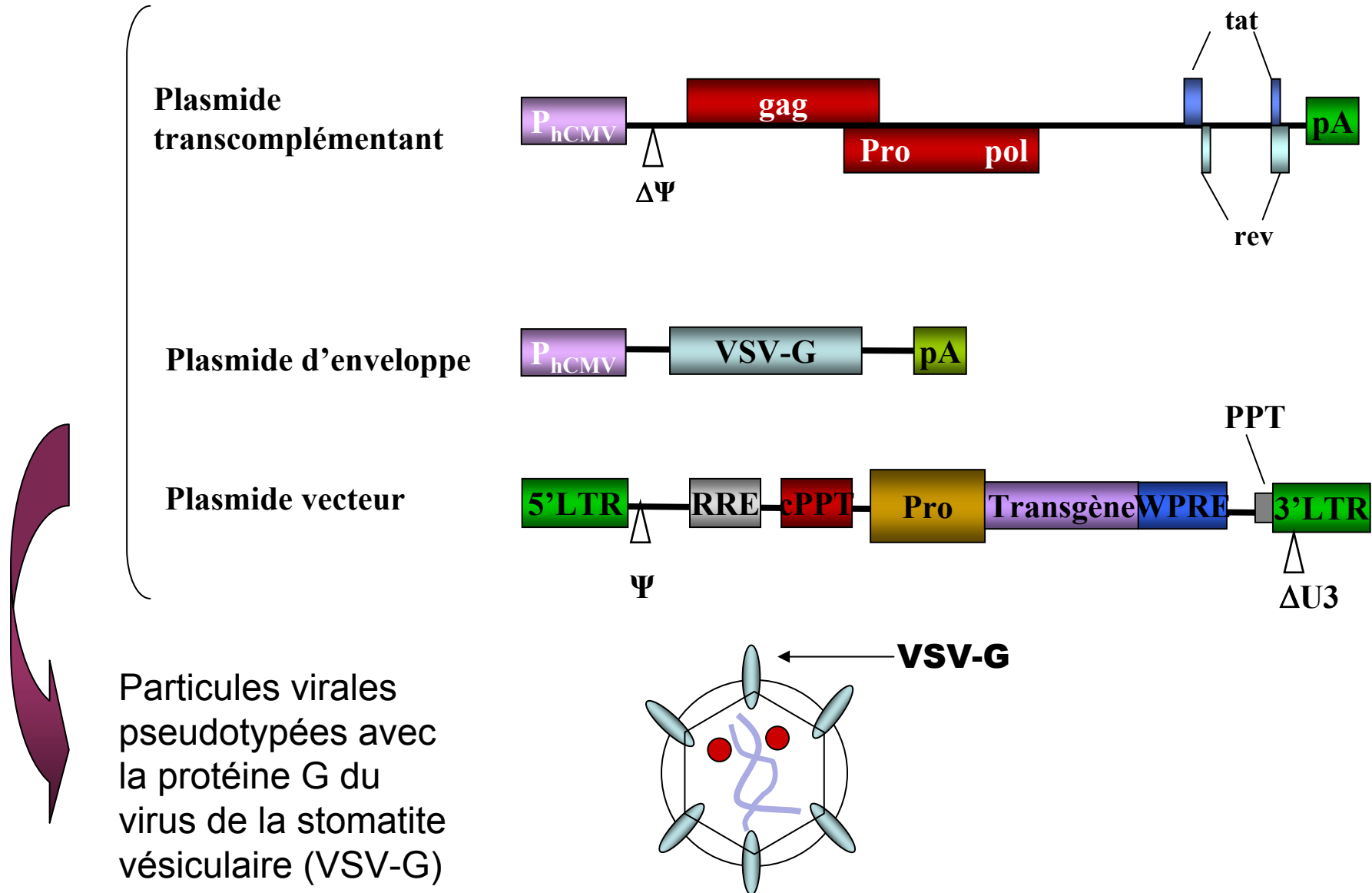


Vecteurs lentiviraux particulièrement adaptés

Avantages des vecteurs lentiviraux

- Transduction des cellules quiescentes et en division
- Expression stable et à long terme du transgène dans le SNC
- Faible toxicité
- Facilité de production à haut titre dénuée de RCR
- Pseudotypage aisé

Vecteurs lentiviraux : méthode de production



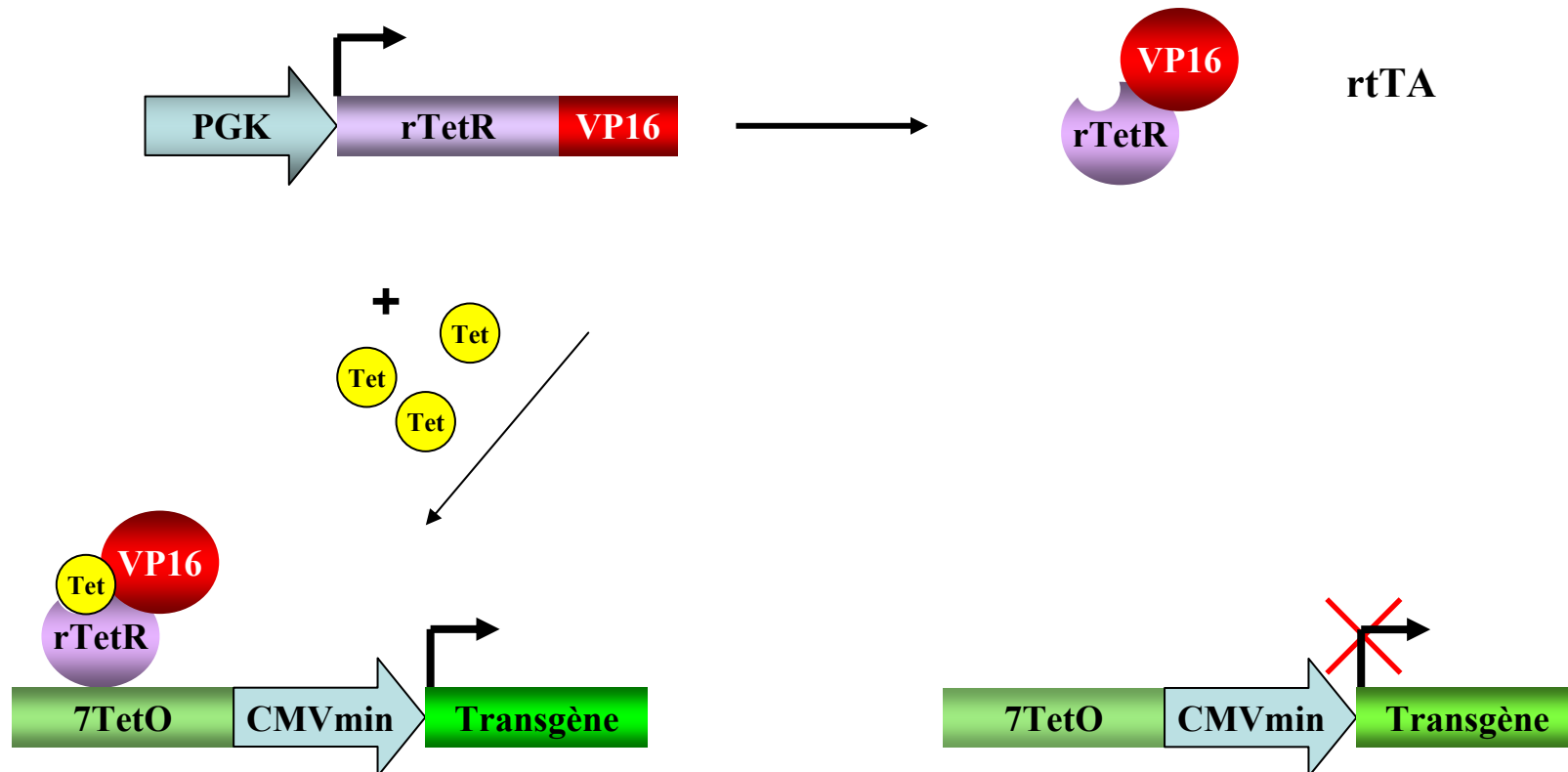
Applications des vecteurs lentiviraux

- Thérapie génique
- Production d'animaux transgéniques (modèles de maladies...)
- Etude de fonction de gènes (surexpression ou inhibition par siARN)

Nécessité d'un système réglable

- Etudes cliniques
 - Moduler l'expression du facteur thérapeutique
 - Arrêt du traitement en cas de complication grave
- Etudes fondamentales
 - Contrôle temporel du transgène
 - Contrôle du niveau d'expression

Le système de régulation inductible par la Tétracycline (Tet-on)

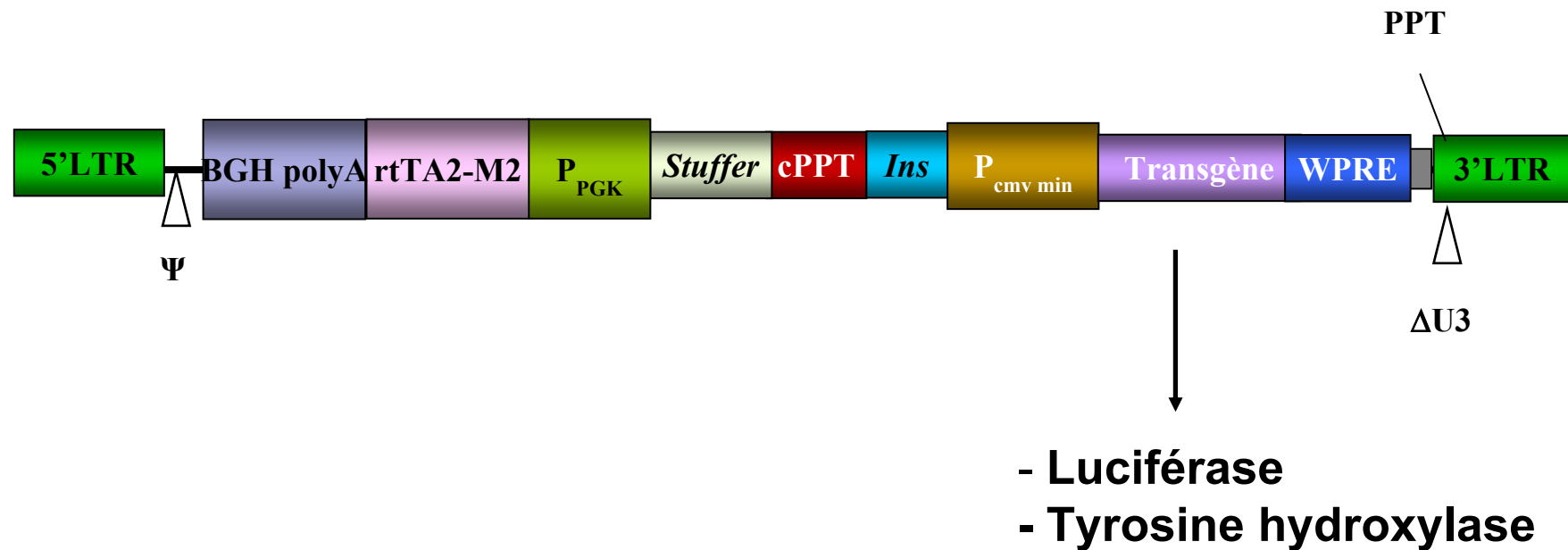


1. Développement d'un seul vecteur lentiviral pour l'expression régulée d'une protéine thérapeutique

Nécessité d'un vecteur unique

- Réduction de la quantité de vecteur administrée:
 - Réduction du risque de mutagenèse insertionnelle
 - Réduction du risque d'immunogénicité lié au vecteur
- Permettre l'expression du transgène et du transactivateur dans la même cellule

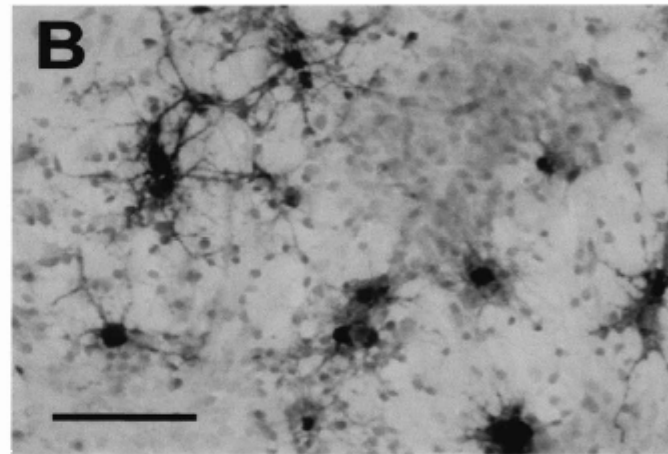
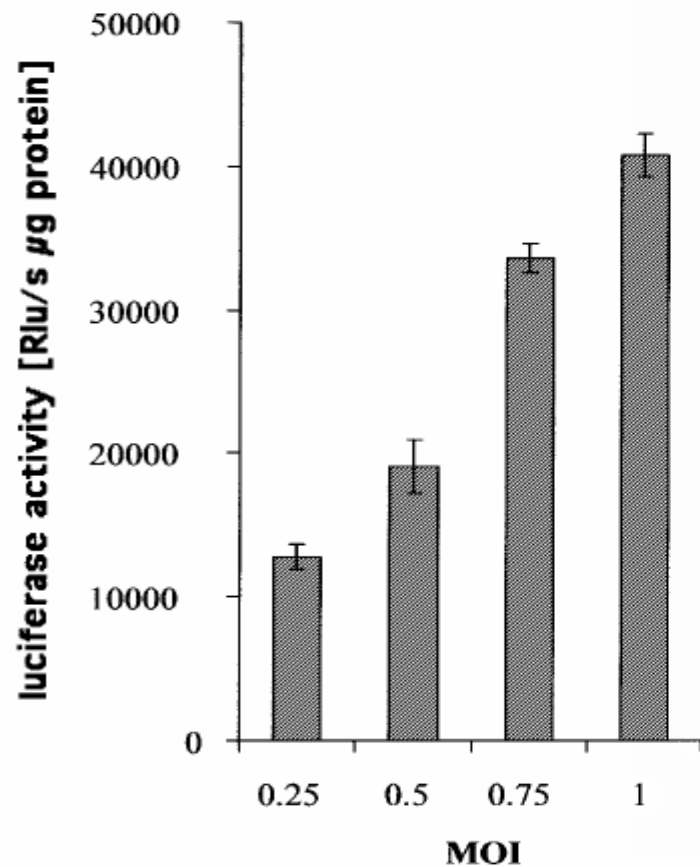
Un vecteur lentiviral unique pour l'expression régulée d'un transgène



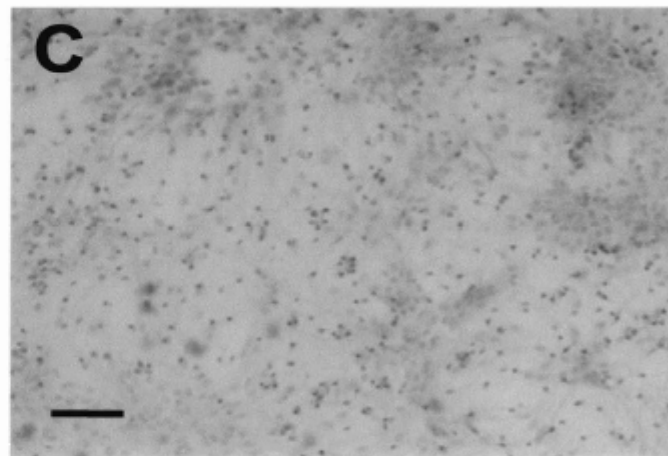
Expression régulée de la luciférase *in vitro*

Transduction d'une culture primaire d'astrocytes

A



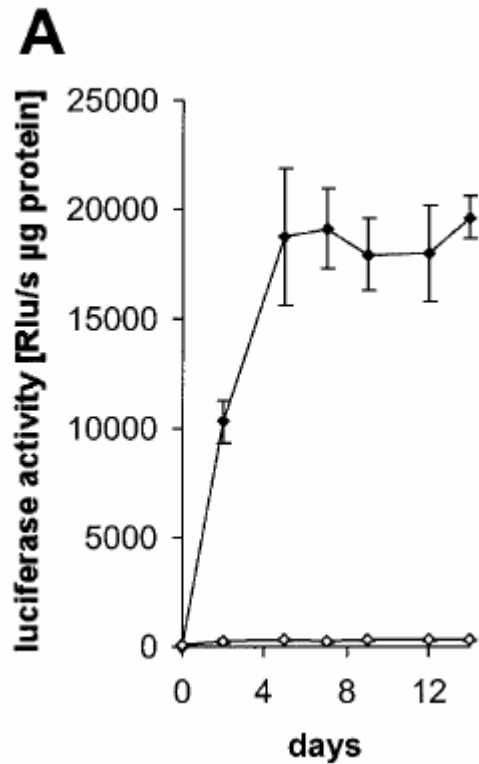
+ Dox



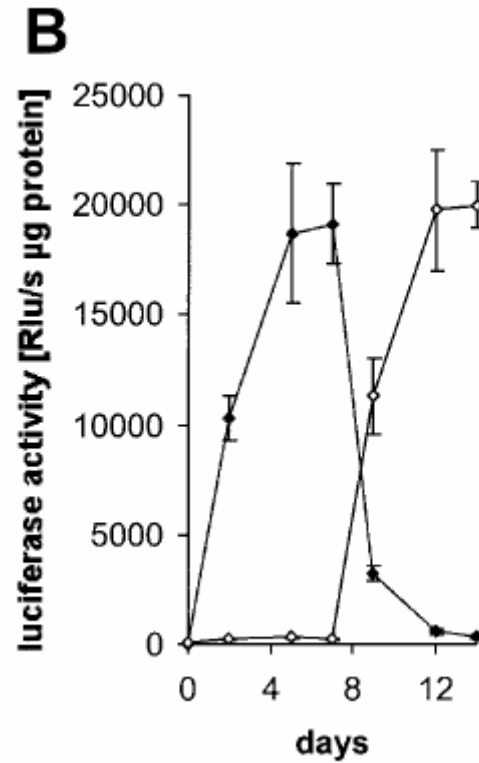
- Dox

Effet de la doxycycline sur l'activité luciférase

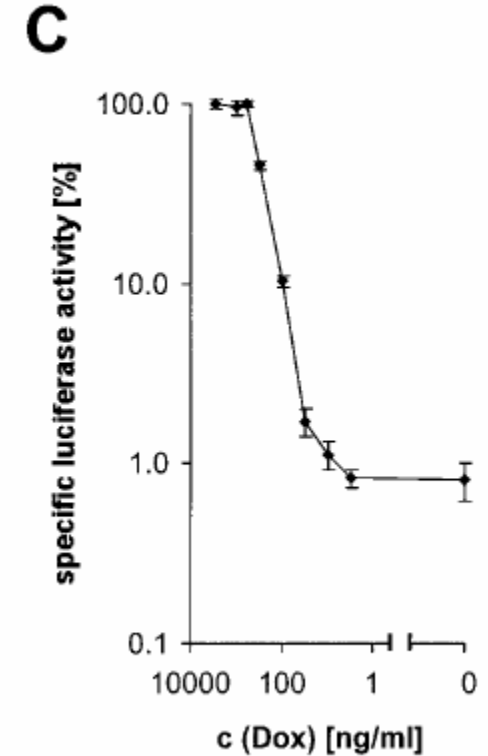
Cinétique d'induction *in vitro*



Réversibilité *in vitro*



Dose optimale *in vitro*



Injection du vecteur lentiviral exprimant de façon régulée la luciférase dans le striatum de rat



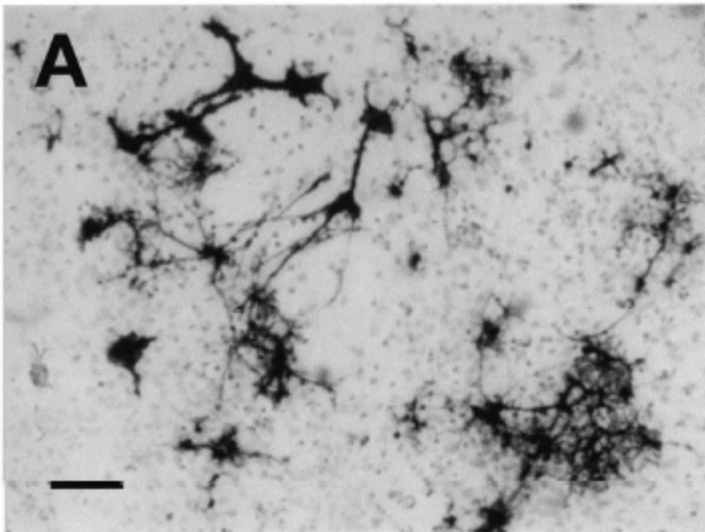
+ Dox

- Dox

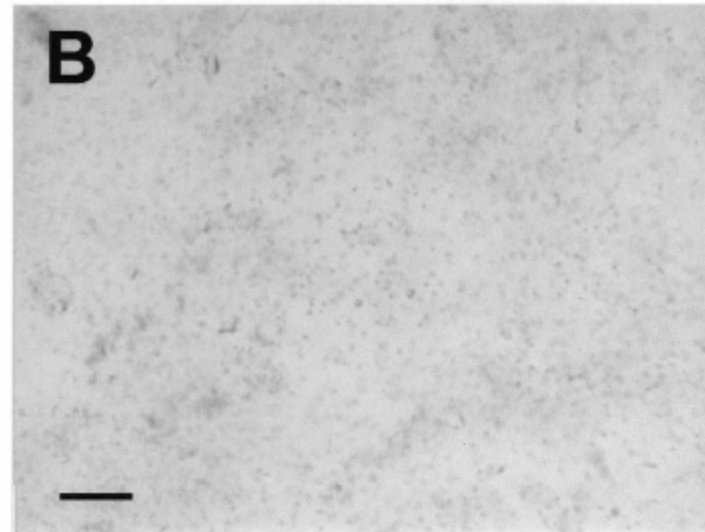
Un vecteur lentiviral exprimant de façon régulée la tyrosine hydroxylase

Evaluation *in vitro*

+ Dox



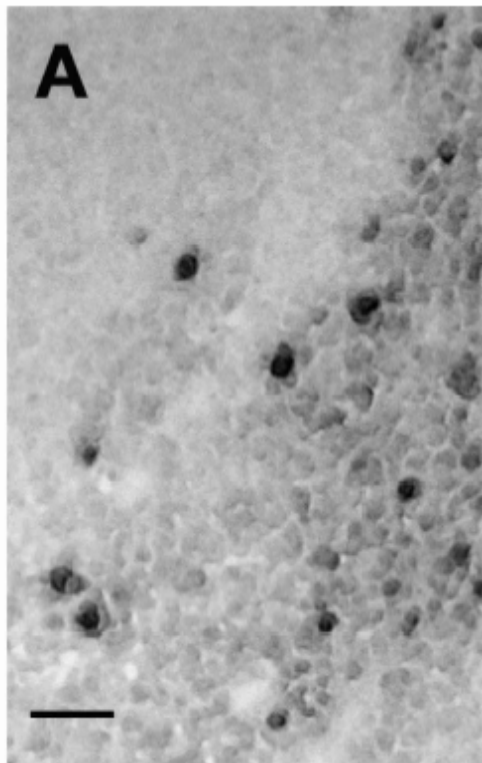
- Dox



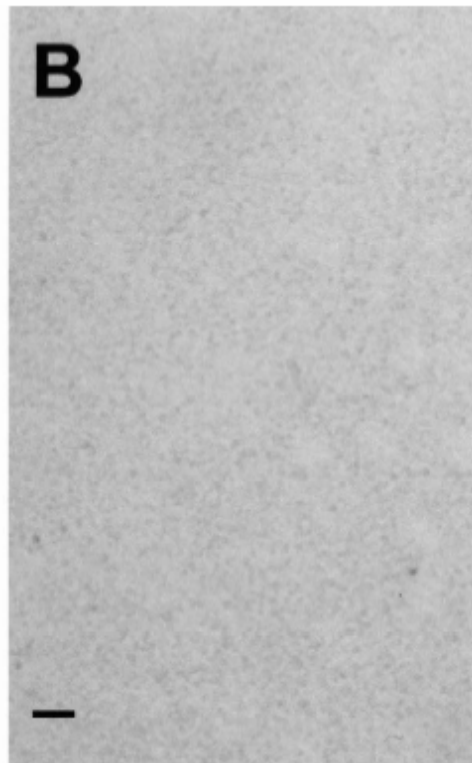
Un vecteur lentiviral exprimant de façon régulée la tyrosine hydroxylase

Evaluation *in vivo*

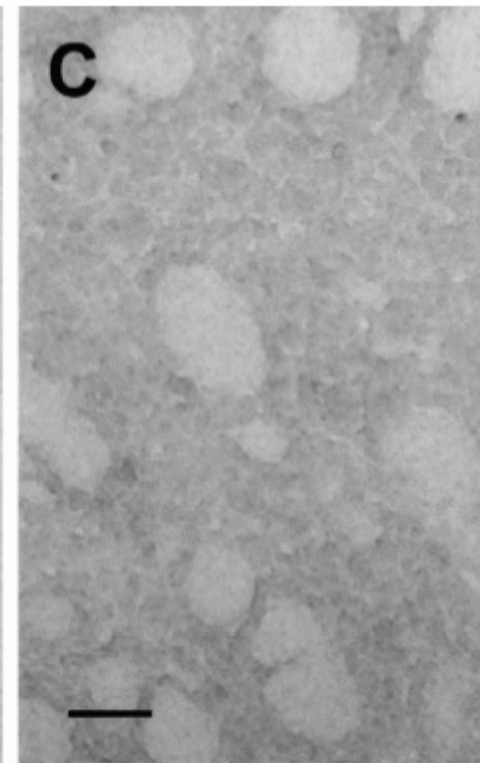
+ Dox



- Dox



Contrôle non injecté



Résumé

- Construction d'un seul vecteur lentiviral portant un système de régulation Tet-on
- Validation *in vitro* et *in vivo*
- Niveau d'induction fort
- Fuite non détectable en absence d'inducteur
- Dose d'inducteur élevée *in vivo*

Applications, limites et voies d'amélioration

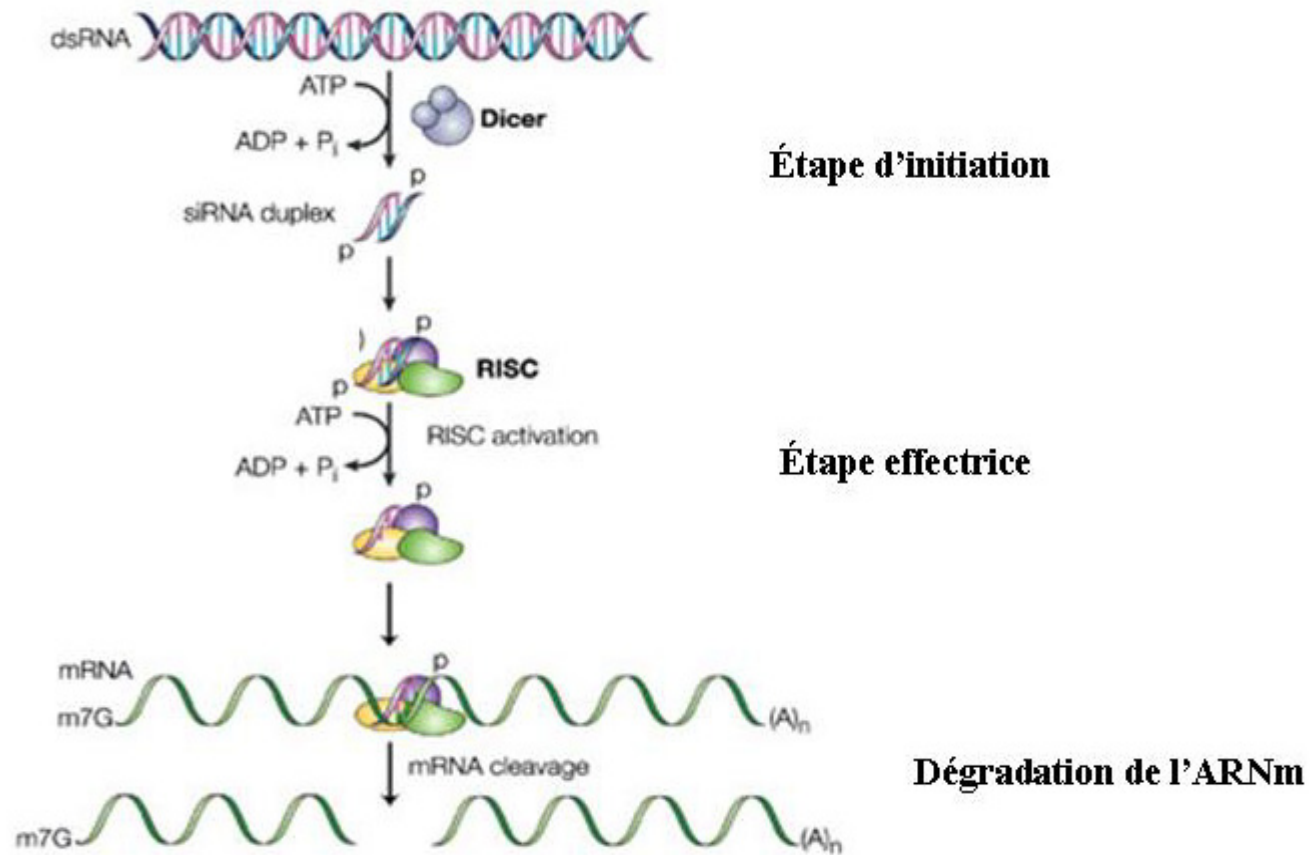
- Application de ce vecteur Tet-on
 - *Utilisation in vitro*
 - *Utilisation chez l'animal*
 - » *Exemple : stratégie de neuroprotection*
 - » *Limites dans une stratégie de remplacement?*
 - *Utilisation en clinique exclue*
- Nombre faible de cellules exprimant le transgène *in vivo* après induction
 - Quantité de vecteur utilisée sous optimale
 - Défaut de retrotranscription d'un génome vecteur long
 - Co-expression du transactivateur et du transgène



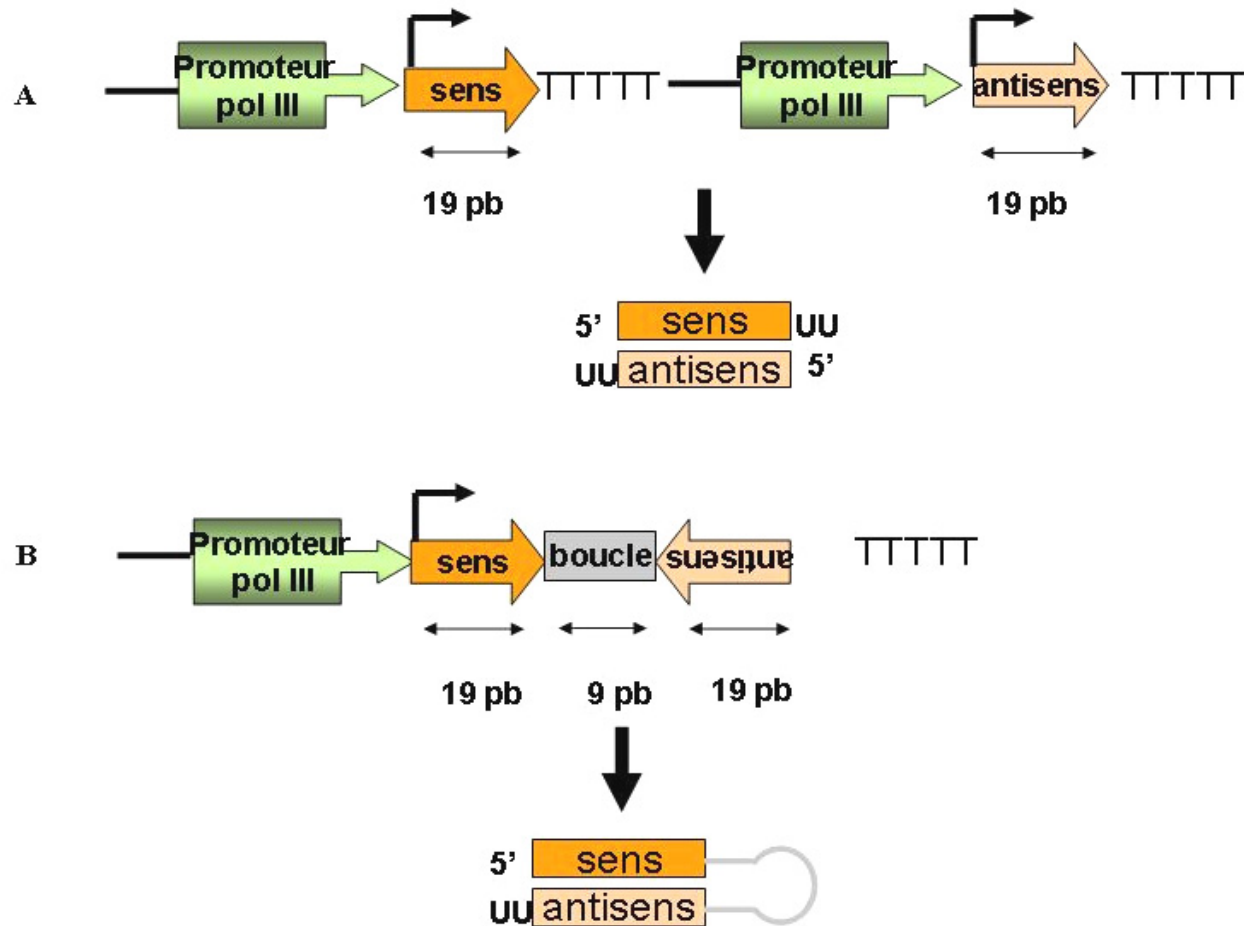
Un vecteur versus deux vecteurs?

2. Développement d'un seul vecteur lentiviral permettant l'expression régulée de shARN

L'ARN interférence



Expression des siARN

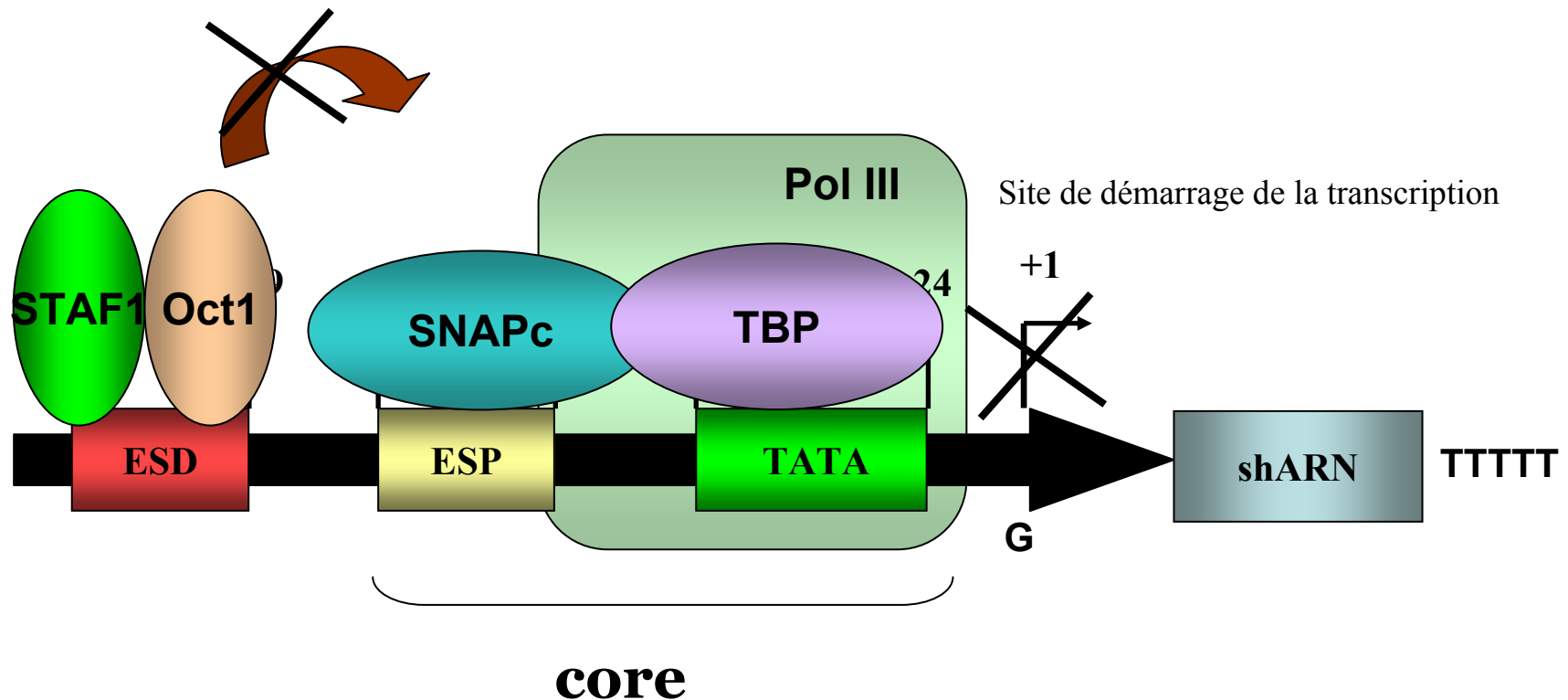


Un promoteur d'ARN Polymérase III

Le promoteur U6

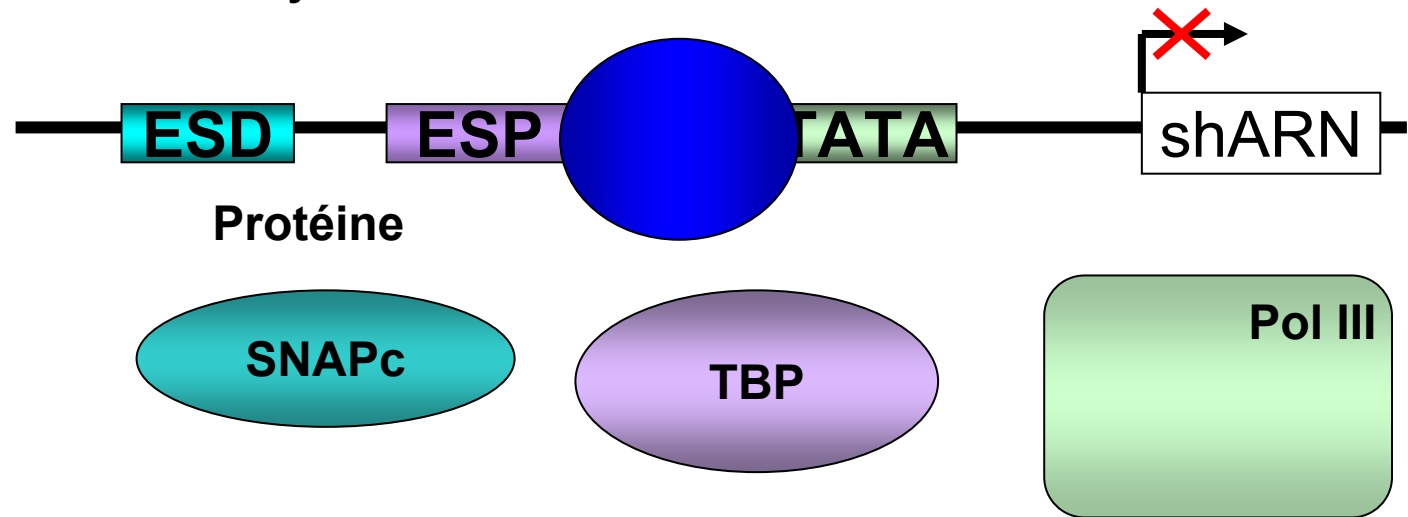
L'expression des shARN nécessite l'utilisation d'un promoteur d'ARN polymérase III

- Débute la transcription à un nucléotide défini (G)
- Arrêt de la transcription par 5 thymidines

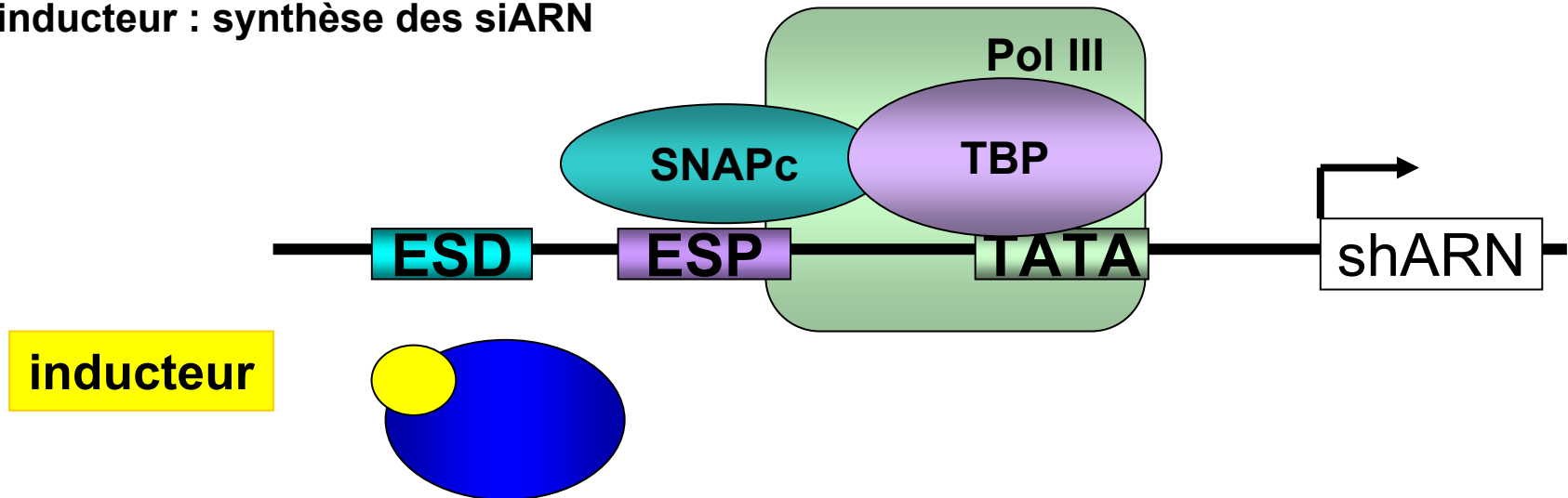


Stratégie négative : encombrement stérique inductible d'un promoteur polymérase III

Sans inducteur : inhibition de la synthèse des siARN

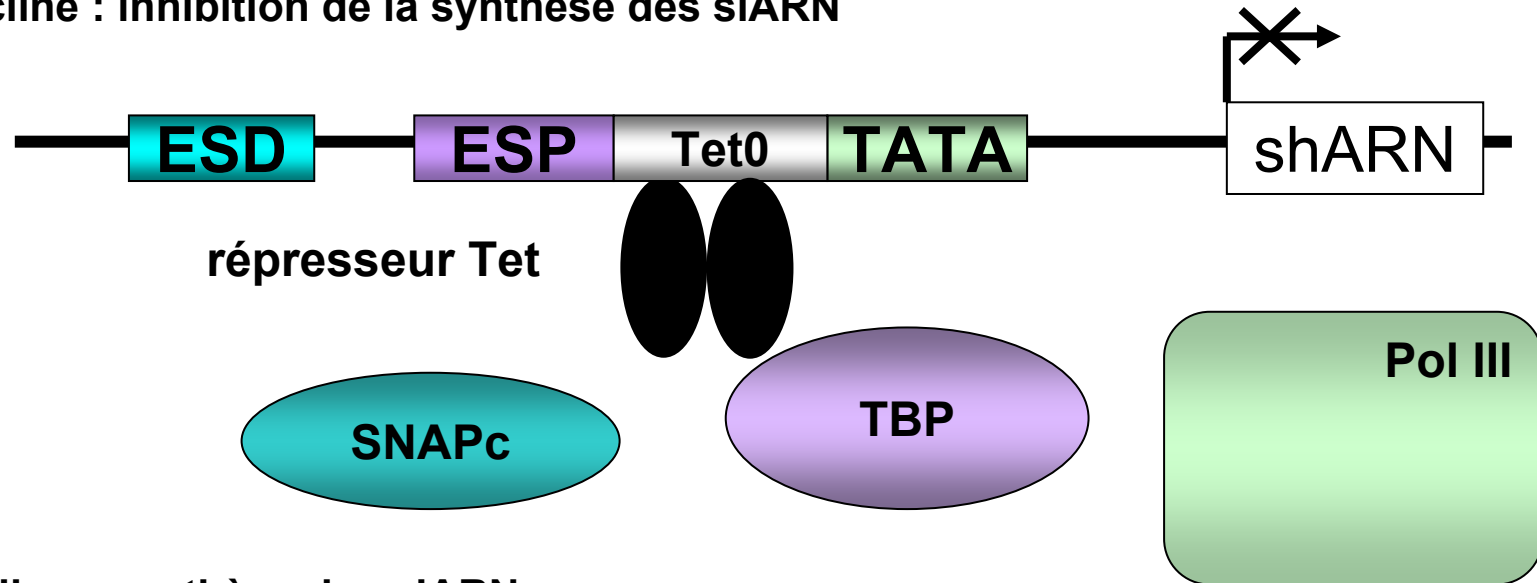


Avec inducteur : synthèse des siARN

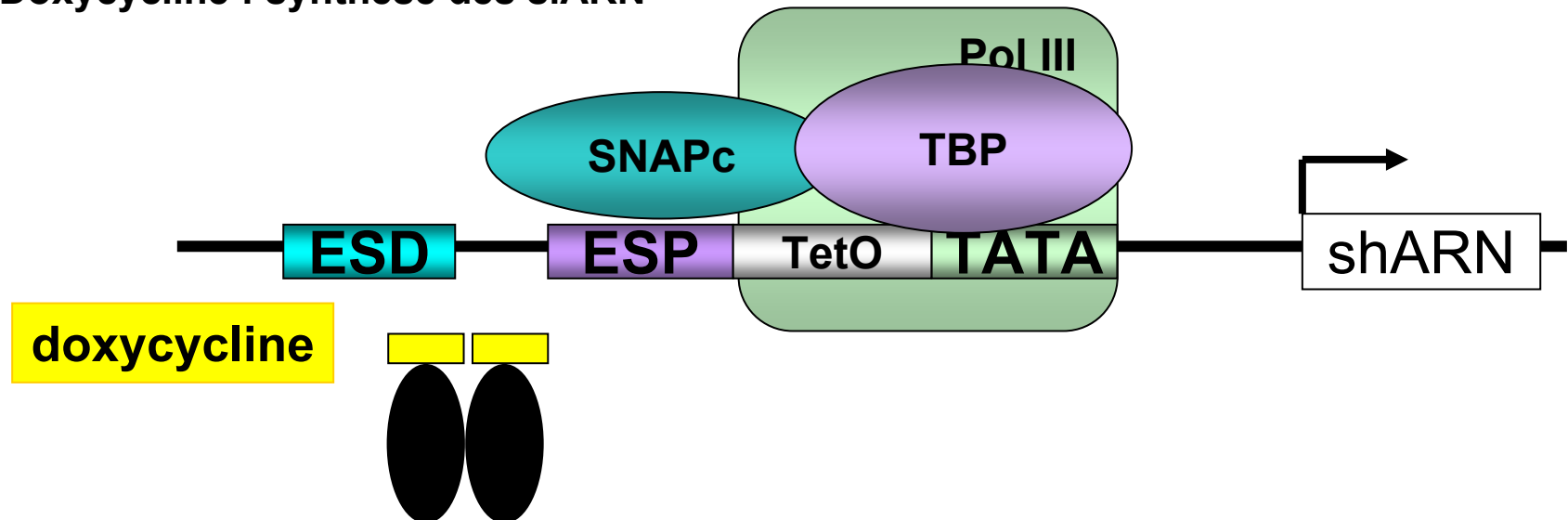


Encombrement stérique inductible du promoteur U6 par le système tétracycline

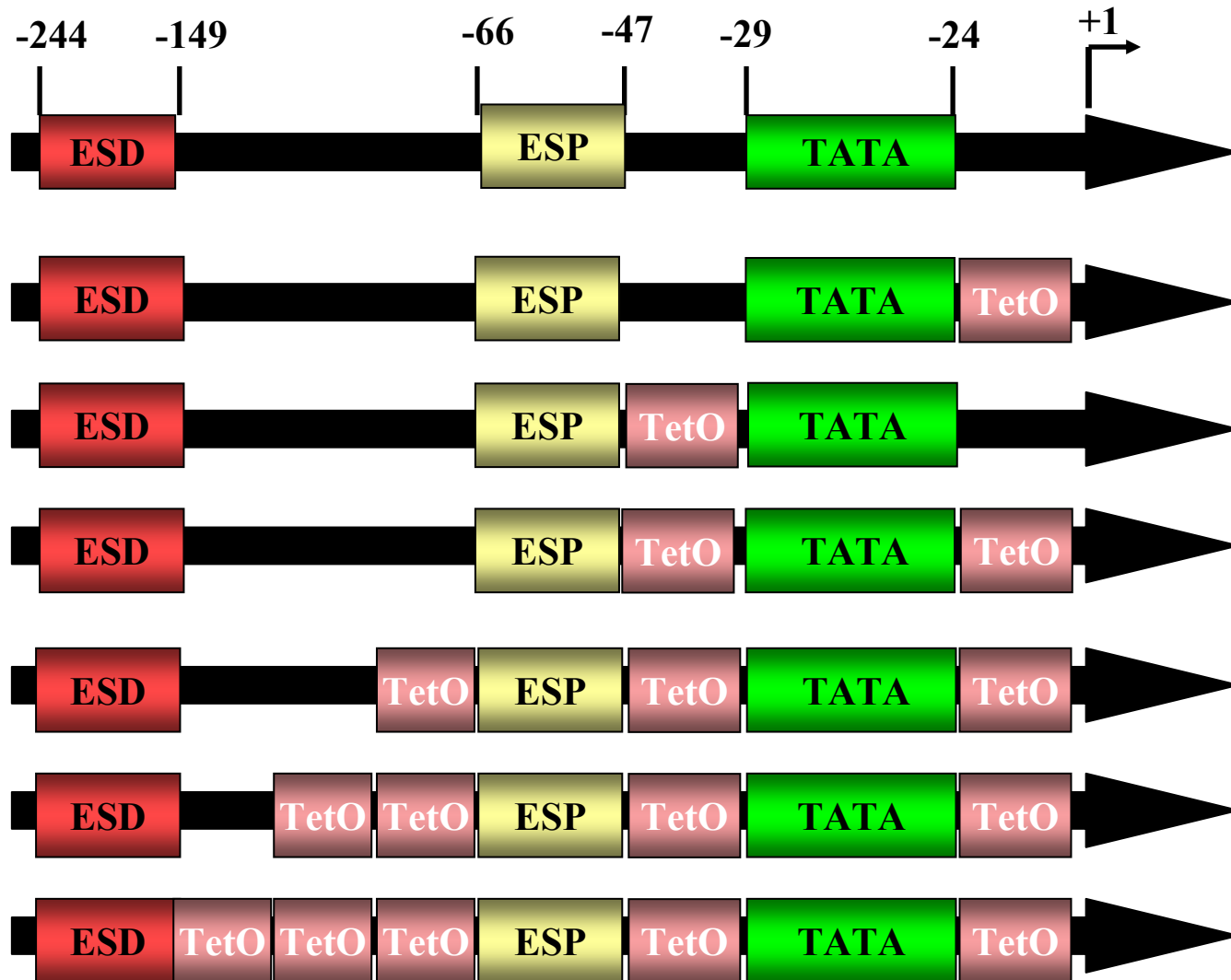
Sans Doxycycline : inhibition de la synthèse des siARN



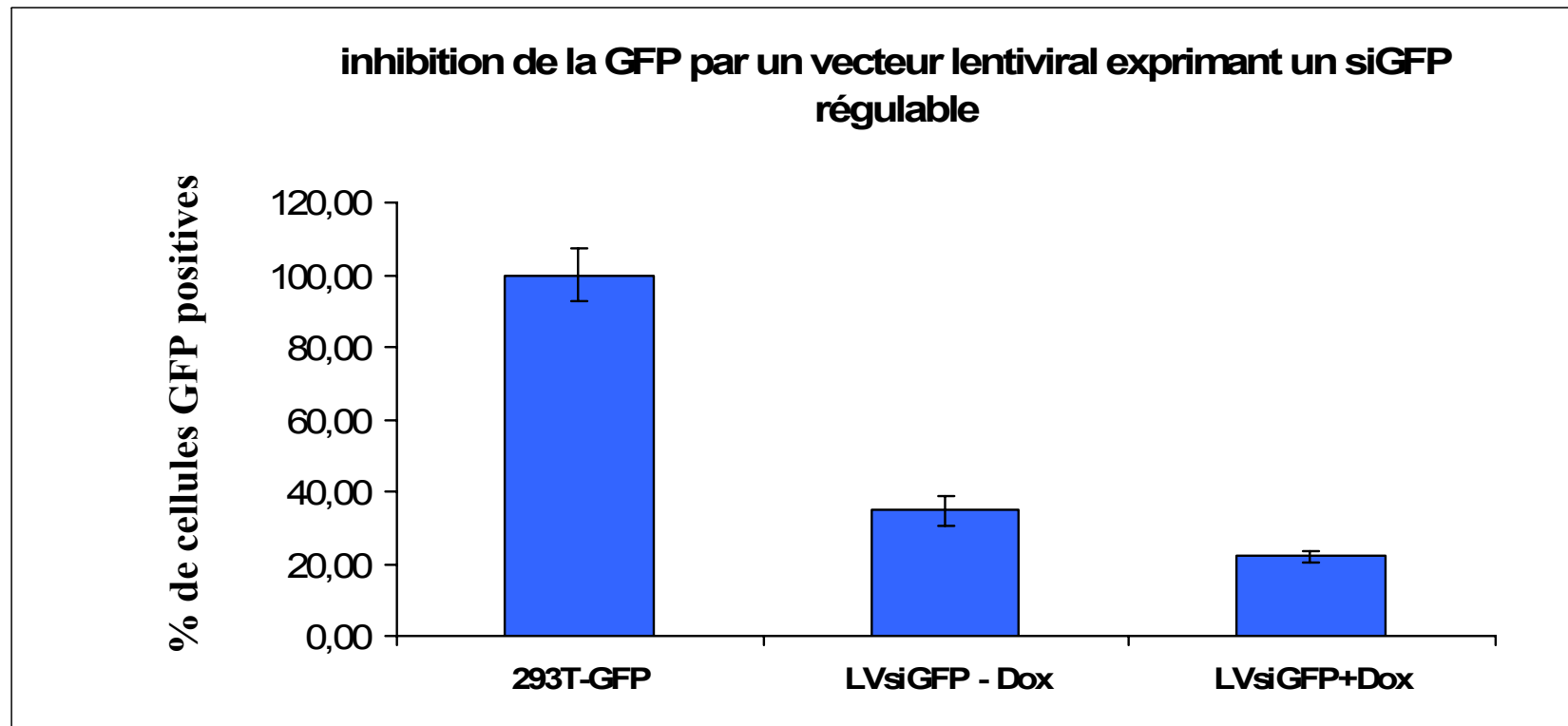
Avec Doxycycline : synthèse des siARN



Un promoteur U6 régulable : Stratégie négative



Inhibition de l'expression de la GFP dans des cellules HEK 293T-GFP

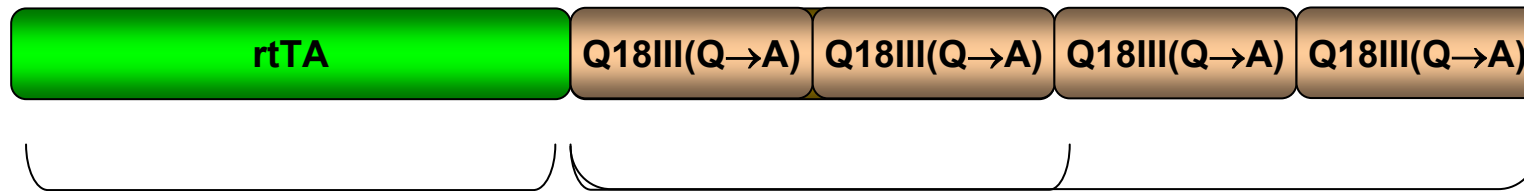


Stratégie positive : adaptation du système Tet-on à un promoteur d'ARN polymérase III

- Utilisation d'un transactivateur de l'ARN polymérase III
- Utilisation d'un promoteur polymérase III minimal inductible par la tétracycline

Développement d'un transactivateur de promoteur polymérase III inducible par la doxycycline

Un nouveau transactivateur rtTA-Oct2

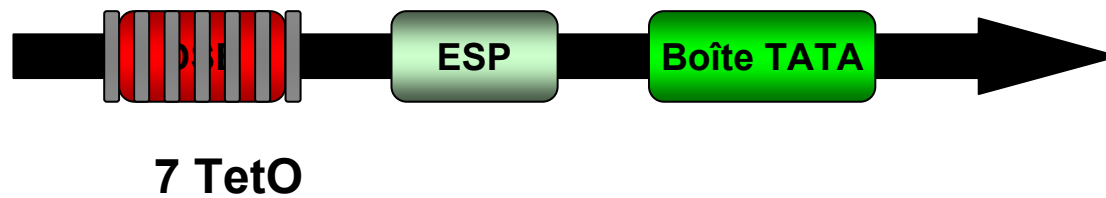


Domaine de liaison à l'ADN du rtTA2-M2

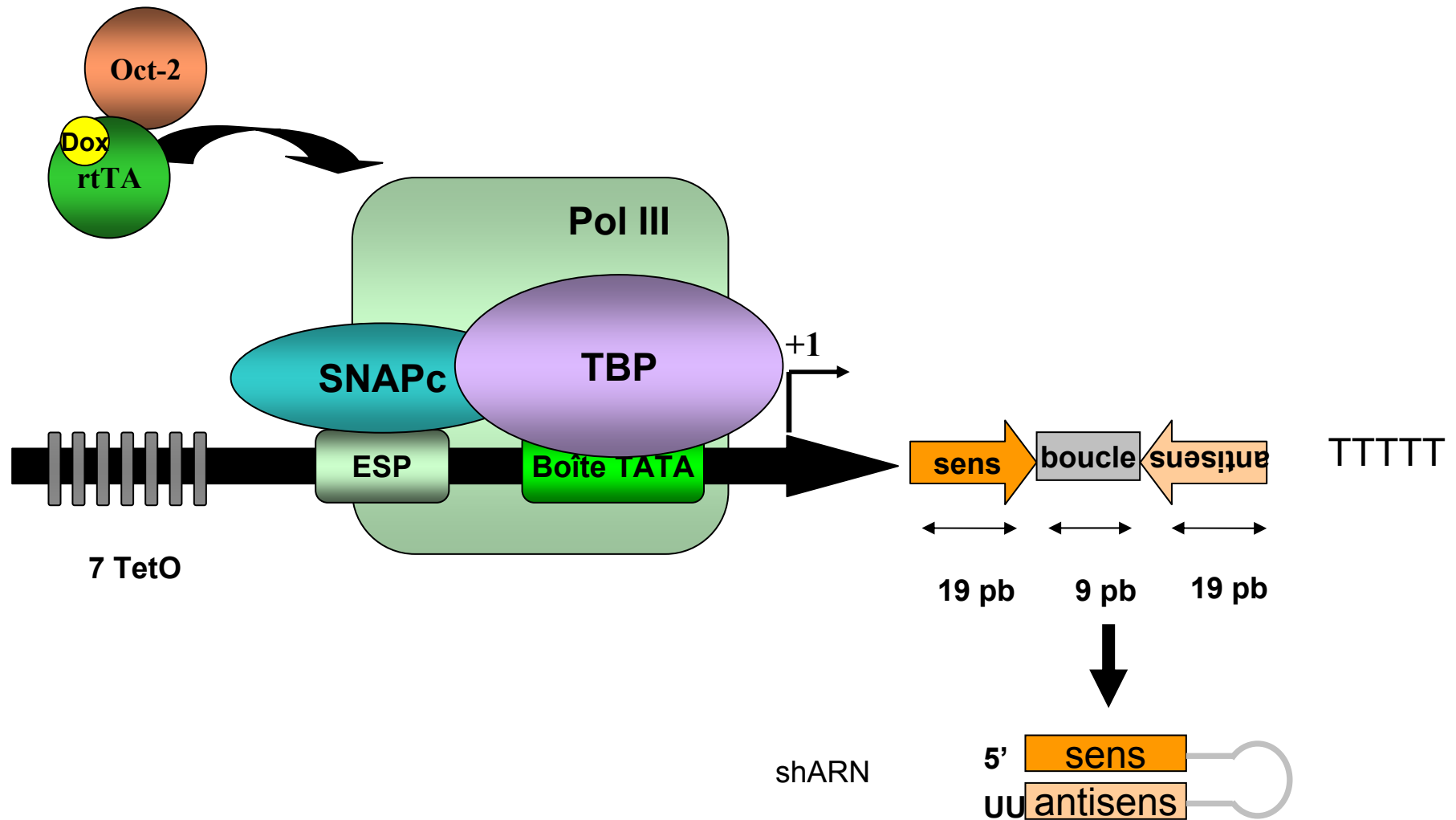
Domaine sensible au transactivateur VP16 du virus HSV

Développement d'un promoteur U6 minimal inductible par la doxycycline

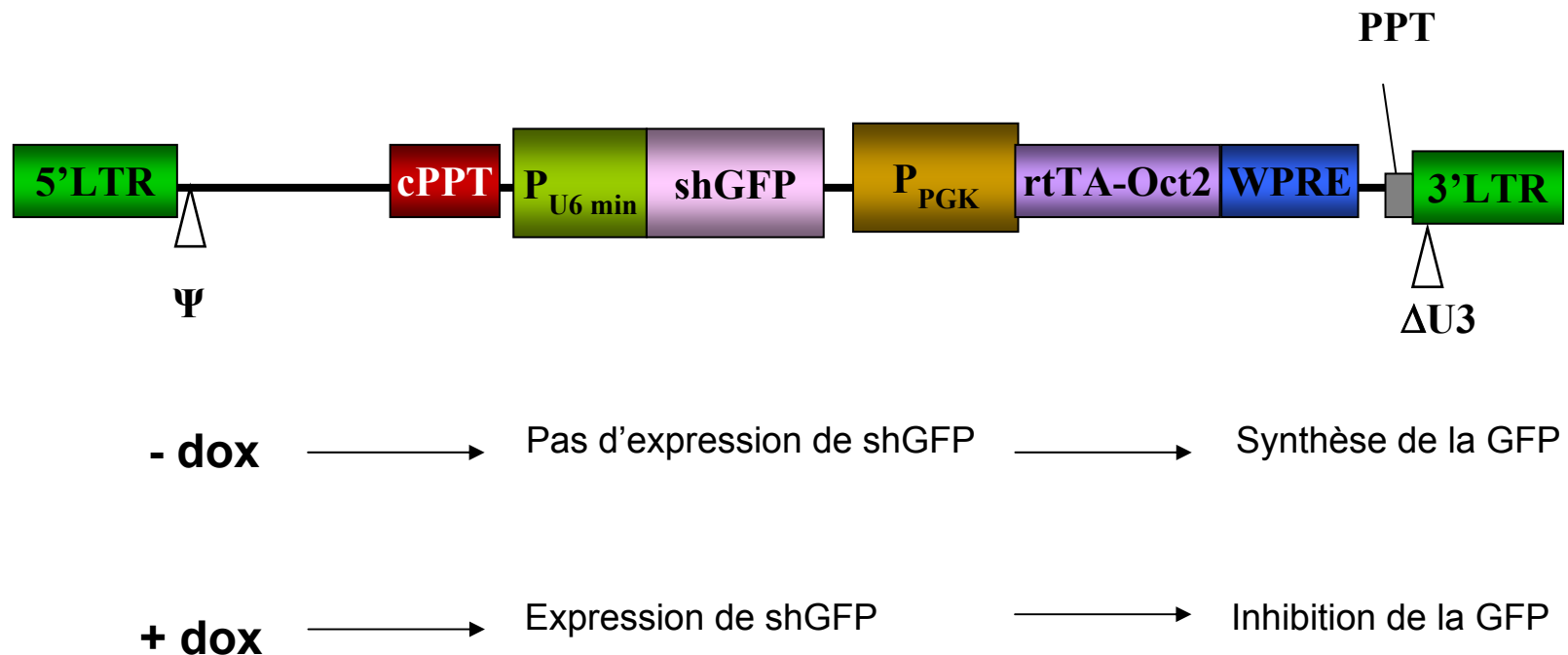
Un nouveau promoteur



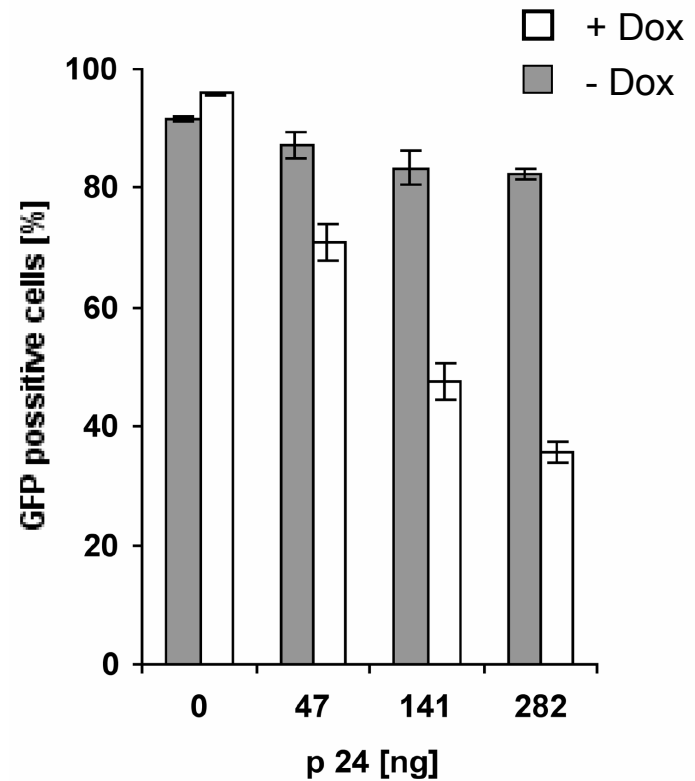
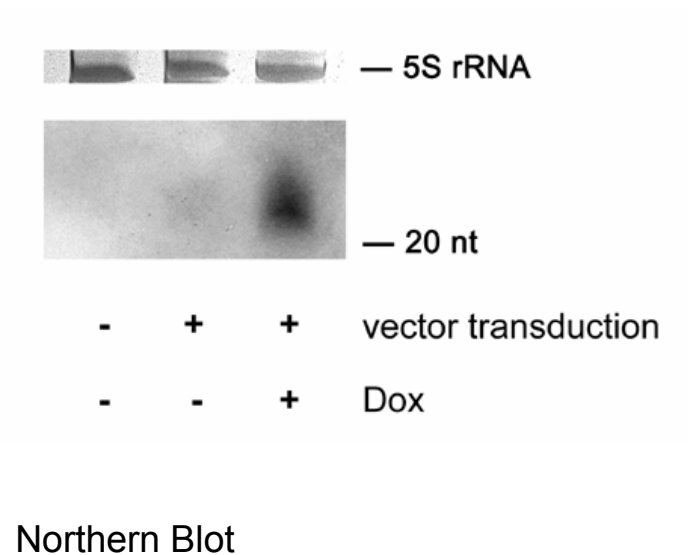
Un promoteur d'ARN Polymérase III inductible par la doxycycline



Un vecteur lentiviral pour l'expression régulée de shARN dirigé contre la GFP

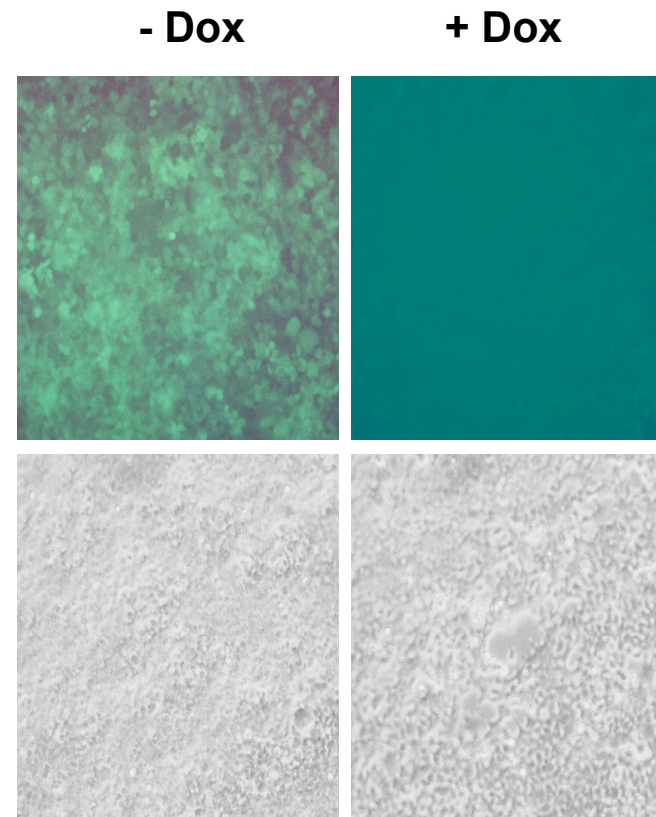
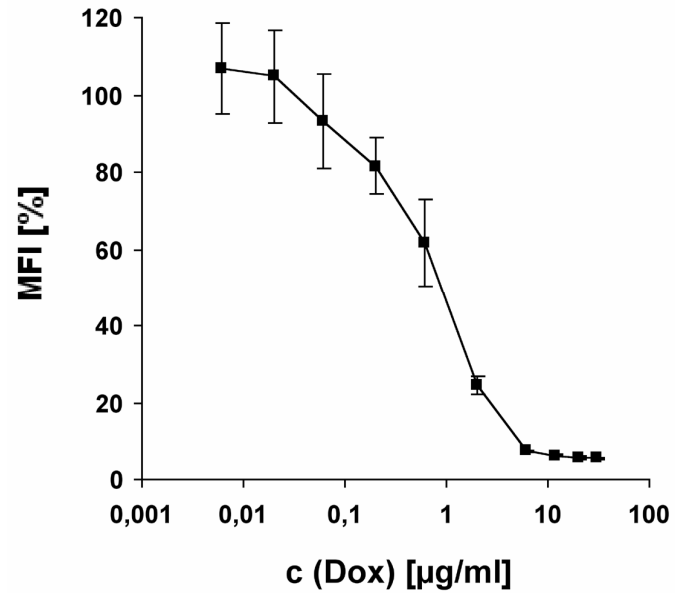


Une expression de shGFP régulée

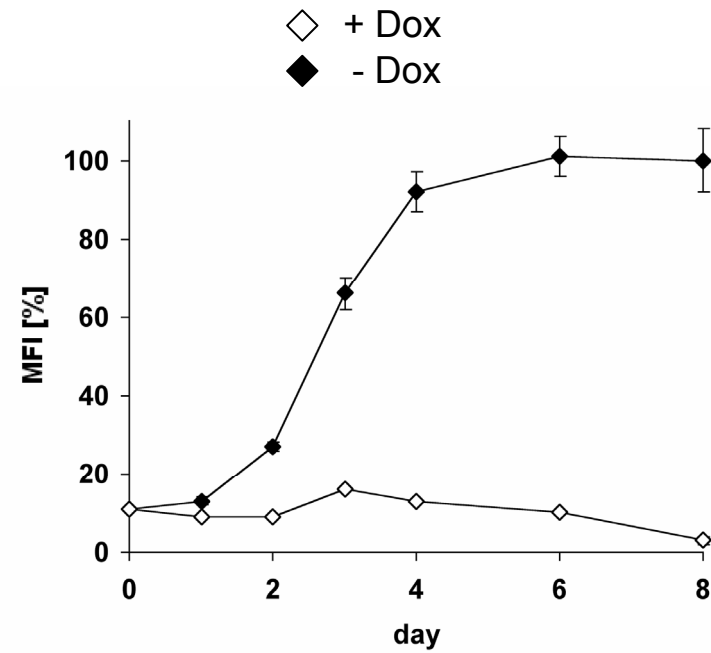
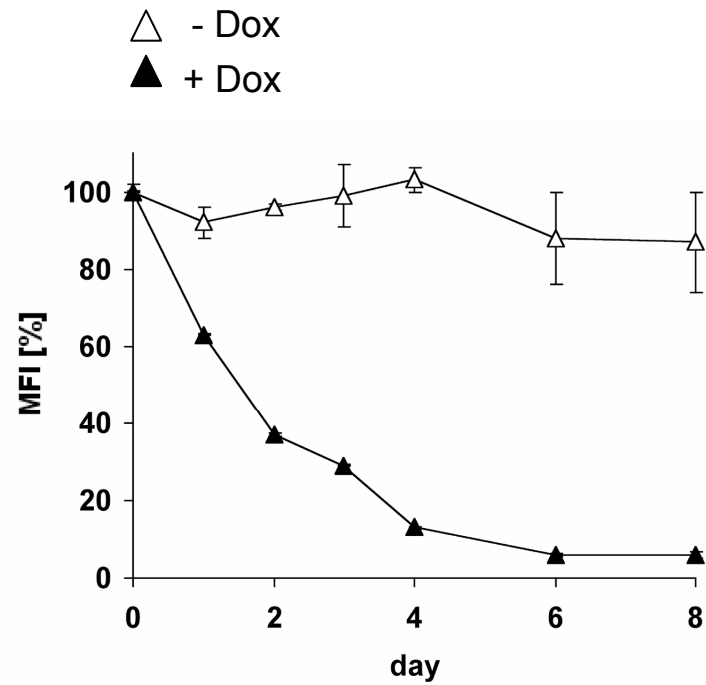


Transduction de cellules HEK293T-GFP avec différentes quantités de vecteur lentiviral exprimant de façon régulée un shGFP

Expression de shGFP en fonction de la concentration de doxycycline

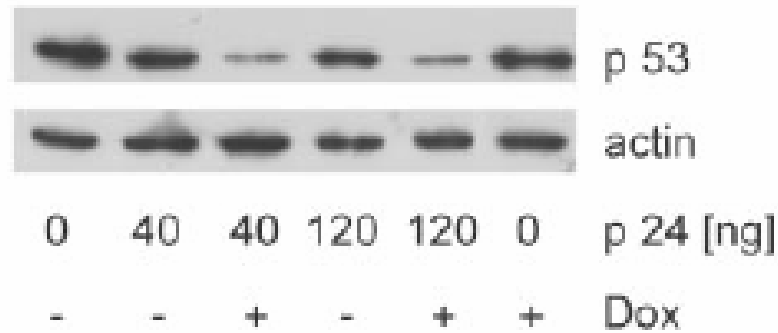


Cinétique d'expression du shARN

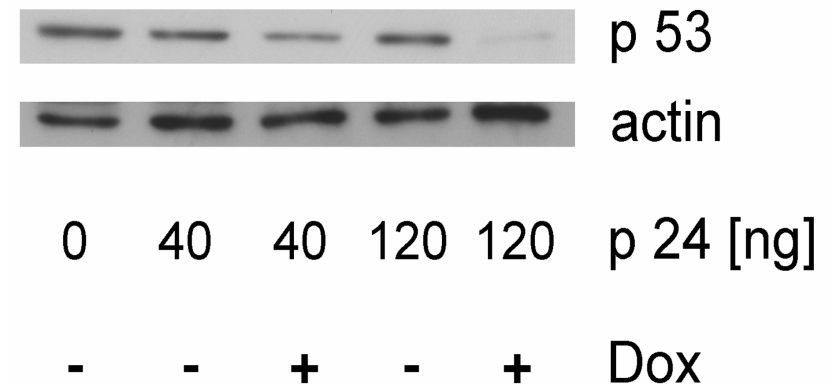


Application du système pour la régulation d'un gène endogène : p53

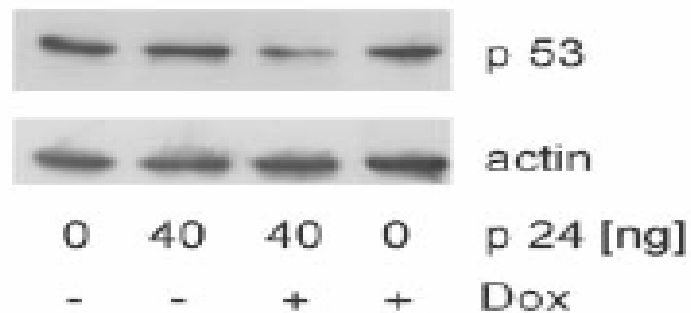
HEK293T



MCF-7



A549

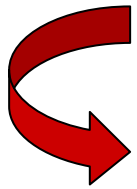


Résumé

- Construction d'un système de régulation qui permet une expression contrôlée par la doxycycline de shARN
- Validation du contrôle d'un gène endogène
- Forte inductibilité
- Système réversible
- Forte concentration de doxycycline

Limites et perspectives

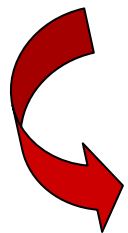
- Dose de doxycycline
- Validation *in vivo*



***Expression de shARN par promoteur pol III
versus promoteur pol II***

Conclusion générale

- Construction d'un seul vecteur lentiviral pour l'expression régulée par le système Tet-on d'une protéine thérapeutique.
- Développement d'un système de régulation de l'expression de shARN inductible par la tétracycline et sa vectorisation.



Problème de l'immunogénicité du transactivateur pour utilisation clinique

Perspectives pour une utilisation clinique

- Se tourner vers un système de régulation d'origine humaine ou « humanisé » pour la clinique
 - Rapamycine
 - ZFP synthétique
- Régulation Physiologique
- La régulation en cas de complication
 - Alternatives :excision du vecteur ou suicide des cellules transduites