

Mémoire de Maîtrise en médecine No 196

Optimisation du transfert de gènes dans la rétine par des vecteurs lentiviraux lors de maladies dégénératives de la rétine

Etudiant

Flavian Tabotta

Tuteur

Prof. Yvan Arsenijevic

Laboratoire de l'Unité de Thérapie Génique et de Biologie des
Cellules Souches, Hôpital Ophtalmique Jules-Gonin

Expert

Prof. Nicole Déglon - Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
(CHUV)

Département des Neurosciences Cliniques (DNC)
Laboratoire de Neurothérapies Cellulaires et Moléculaires
(LNCM)

Lausanne, Décembre 2011

Abstract :

Certaines dégénérescences rétiniennes sont engendrées par des mutations génétiques et conduisent à la perte des cellules photosensibles, les photorécepteurs (cônes et/ou bâtonnets), et donc à la cécité (Roy et al., 2010). La prévalence est de 1/3000 chez les Caucasiens. Les Rétinites Pigmentaires (RP) en composent la majorité des cas, suivent l'Amaurose congénitale de Leber et la maladie de Stargardt. Il n'y a pas une mutation type associée à une maladie mais diverses mutations peuvent aboutir à une dégénérescence de la rétine. Tout comme le reste du système nerveux central, la rétine lésée n'a pas les capacités de se régénérer. Un objectif du traitement est de ralentir la dégénérescence de la rétine dans le but de la stabiliser. La thérapie génique constitue actuellement la seule approche thérapeutique à même de traiter les dégénérescences rétiniennes d'origine génétique. Elle consiste à utiliser un virus modifié, qui n'a plus les capacités de se reproduire, appelé vecteur pour cibler certaines cellules afin d'ajouter un gène sain ou d'inhiber un gène malade. Les virus associés à l'adénovirus (AAV) et les Lentivirus (LV) sont les 2 principaux types de virus utilisés en thérapie génique en ophtalmologie. D'autres vecteurs existent, comme les adénovirus et le virus de l'anémie infectieuse équine. Des études de thérapie génique effectuées chez l'homme avec le vecteur AAV ont démontré une sensible amélioration des fonctions visuelles (acuité visuelle, champ visuel, pupillométrie et le déplacement dans un environnement avec une lumière tamisée) chez des patients atteints d'Amaurose congénitale de Leber (Maguire et al., Ali et al., Hauswirth et al., Bennett et al.). Le vecteur utilisé au cours de ce travail est un LV, qui a pour avantage de pouvoir transporter de grands gènes. Lorsque ce vecteur est pseudotypé avec une enveloppe VSVG, il transduit (transférer un gène qui sera fonctionnel dans la cellule cible) bien l'épithélium pigmentaire rétinien (nécessaire à la survie et à la fonction des photorécepteurs). Afin de changer le tropisme du vecteur, celui testé dans cette étude contient une enveloppe de type Mokola qui cible efficacement les cellules gliales du cerveau et donc probablement aussi les cellules de Müller de la rétine. Le but à court terme est de transformer génétiquement ces cellules pour leur faire sécréter des molécules favorisant la survie des photorécepteurs. Pour révéler la cellule ciblée par le vecteur, le gène qui sera exprimé dans les cellules transduites code pour la protéine fluorescente verte 2 (GFPII) et n'a pas de fonction thérapeutique. Après avoir produit le virus, deux types de souris ont été injectées : des souris dépourvues du gène de la rhodopsine appelées Rho -/- et des souris sauvages appelées C57BL6. Les souris Rho -/- ont été choisies en tant que modèle de dégénérescence rétinienne et les souris C57BL6 en tant que comparatif. Les souris Rho -/- et C57BL6 ont été injectées entre le 2^{ème} et le 3^{ème} mois de vie et sacrifiées 7 jours après. Des coupes histologiques de la rétine ont permis de mesurer et comparer pour chaque œil, les distances de transduction du RPE et de la neurorétine (= toute la rétine sauf le RPE). La distance sur laquelle le RPE est transduit détermine la taille de la bulle d'injection alors que la distance sur laquelle la neurorétine est transduite détermine la capacité du vecteur à diffuser dans la rétine. Les résultats montrent une expression plus importante de la GFPII dans le RPE que dans la neurorétine chez les souris Rho -/- et C57BL6. Les principales cellules transduites au

niveau de la neurorétine sont, comme attendu, les cellules de Müller. Lorsque l'on compare les proportions de neurorétine et de RPE transduites, on constate qu'il y a globalement eu une meilleure transduction chez les souris Rho -/- que chez les souris C57BL6. Cela signifie que le vecteur est plus efficace pour transduire une rétine dégénérée qu'une rétine saine. Pour déterminer quels types de cellules exprimaient la GFP, des anticorps spécifiques de certains types de cellules ont été utilisés. Ces résultats sont similaires à ceux d'autres études effectuées précédemment, dont celle de Calame et al. en 2011, et tendent à prouver que le vecteur lentiviral avec l'enveloppe Mokola et le promoteur EF4 est idéal pour transduire avec un gène thérapeutique des cellules de Müller dans des rétines en dégénérescence.

Mots-clés : dégénérescences rétinienne ; gènes ; vecteurs lentiviraux ; thérapie génique.

1. Thème de l'étude :

Généralités : Certaines dégénérescences rétinienne sont engendrées par des mutations génétiques et conduisent à la perte des cellules photosensibles, les photorécepteurs (cônes et/ou bâtonnets), et donc à la cécité (Roy et al., 2010). La prévalence est de 1/3000 chez les Caucasiens. Les plus fréquentes de ces formes héréditaires sont les Rétinites Pigmentaires (RP). Une forme plus sévère qui touche l'enfant est appelée amaurose congénitale de Leber (LCA) et est moins fréquente (1/100'000). Concernant les RP, divers gènes peuvent en être la cause et environ 200 loci ont été identifiés jusqu'à présent, mais ils n'expliquent que 50% des cas de RP (source : <http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/sum-dis.htm#D-graph>). Pour la LCA, 14 gènes sont responsables pour 60% des cas. Dans la majorité des cas, la RP mène à une perte de la vision périphérique qui conduit à une vision « tunnelisée ». Les gènes en cause codent pour des protéines contenues dans les photorécepteurs ou dans l'épithélium pigmentaire (RPE). Le RPE est une couche de cellules au contact des photorécepteurs et qui joue un rôle dans leur survie et leur fonction sensorielle (Ali et al., 2000). Les dégénérescences héréditaires de la rétine sont des maladies progressives qui entraînent une perte totale de la vision avant 20 ans pour les LCA, voir plus tard pour les RP. Malheureusement, les cellules de la rétine sont post-mitotiques (elles n'ont plus la capacité de se diviser), ce qui rend impossible la régénération de la rétine lésée. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour ces maladies.

Avancées thérapeutiques : Afin de ralentir la dégénérescence des photorécepteurs, une des pistes thérapeutiques est la thérapie génique, qui vise à redonner à une cellule la fonction ôtée par une mutation d'un gène. Pour cela, un vecteur d'origine virale est utilisé afin de transduire (transférer efficacement un gène qui sera fonctionnel dans la cellule cible) les photorécepteurs et d'insérer dans leur génome un ou plusieurs gènes d'intérêt. Il y a dans chaque cellule deux exemplaires de chaque chromosome, et donc deux exemplaires de chaque gène. Il est souvent question dans ces maladies de gènes récessifs. La rétine est une structure idéale pour la thérapie génique : en raison de son appartenance au système nerveux central et de la barrière sang-rétine (identique

à la barrière hématoencéphalique du cerveau), elle est presque dépourvue de système immunitaire, ce qui limite la réponse immunitaire et la dissémination des vecteurs viraux dans tout l'organisme (Surace et al., 2008). Tout comme le reste du système nerveux central, la rétine ne se régénère pas. Ainsi, la thérapie génique vise à sauver les cellules encore viables dans le but de stopper la progression de la maladie, et à restaurer des fonctions visuelles. D'un point de vue thérapeutique dans le cas de maladies monogéniques, il faut corriger seulement un exemplaire du gène pour espérer avoir un effet bénéfique. Dans d'autres cas, la thérapie génique peut également servir à inhiber certains gènes favorisant la dégénérescence des photorécepteurs (Colella et al., 2008 ; Smith et al., 2009). Ce cas de figure se manifeste souvent dans le cas de mutations dominantes. Ainsi la survie des photorécepteurs augmente et donc la progression de la maladie ralentit. Les dégénérescences rétinienne les plus difficiles à traiter sont celles qui progressent rapidement et qui débutent tôt dans la vie car la fenêtre temporelle pour initier un traitement s'en trouve restreinte (la LCA en fait partie ; Surace et Auricchio, 2008 ; Smith et al., 2009).

Efficacité des traitements : Les effets bénéfiques de la thérapie génique seront donc dépendants d'une part de l'avancement de la maladie et d'autre part de l'efficacité du vecteur à délivrer le gène d'intérêt. L'enfance constitue le moment le plus opportun pour la thérapie génique : même si les enfants ont une meilleure acuité visuelle que les adultes avant le traitement, le gain global de fonctions visuelles s'avère plus grand chez les enfants (Maguire et al., 2009).

2. Connaissances actuelles :

Les vecteurs sont des virus modifiés génétiquement qui permettent de transférer une information génétique (dans le cas présent un gène) dans un type de cellule précis dans le but que la cellule exprime cette information. Ces vecteurs sont dépourvus des gènes codant pour des protéines pathogènes mais contiennent les structures nécessaires à la transduction du gène thérapeutique dans les cellules cibles (enveloppe, capsid,...).

Un des types de vecteurs les plus utilisés en recherche en ophtalmologie est le vecteur AAV (Adeno-associated viruses). Les AAV sont de la famille des parvovirus et ont un ADN linéaire simple brin. Ils ne possèdent pas d'enveloppe et c'est donc le sérotype de la capsid qui détermine la spécificité et l'efficacité du vecteur à transduire les cellules ainsi que le temps entre l'injection et l'expression du transgène (Surace et al., 2008). Les vecteurs AAV ne s'intègrent pas dans l'ADN des cellules cibles mais demeurent dans le noyau en tant qu'ADN circulaire ou épisome une fois le brin complémentaire synthétisé. Cela permet de diminuer les risques liés aux insertions du virus n'importe où dans l'ADN (risque de perte de fonction de gènes ou d'induire une tumeur). Mais, dépendant du sérotype, le pic d'expression peut prendre jusqu'à 6 semaines (Bennett et al., 1997) pour être atteint du fait de la nécessité de synthétiser le brin complémentaire pour permettre une expression du transgène. Les vecteurs AAV ne sont pas pathogènes pour l'être humain et induisent une faible réponse immunitaire, autorisant ainsi l'expression à long terme de transgènes, ce qui en fait des candidats de choix pour la thérapie génique. Mais contrairement au Lentivirus (LV), il ne peut pas, de par sa petite taille, transporter et transférer de grands gènes (Smith et al., 2009).

Quant aux vecteurs lentiviraux (LVs), ils appartiennent à la famille des rétrovirus. Ils sont formés d'un ARN linéaire simple brin et nécessitent d'être transformés en ADN pour pouvoir être intégrés dans le génome de la cellule cible avant d'être exprimés. L'insertion du virus dans l'ADN de la cellule infectée comporte le risque de développement de cancers car il n'est pas possible de déterminer précisément où le virus va être intégré dans le génome. Ceci s'explique par le fait que selon où le virus s'insère, il peut modifier le niveau d'expression du ou des gènes situés juste après le génome viral (on parle mutagénèse insertionnelle). Ainsi, l'augmentation de l'expression d'un gène activant la division cellulaire ou la diminution de l'expression d'un gène réprimant la division cellulaire peut mener au développement de cancers. Les rétrovirus et les lentivirus s'insèrent préférentiellement dans les régions ouvertes de la chromatine où la transcription est la plus active. Néanmoins, aucune expérience n'a pu montrer que les vecteurs dérivés d'HIV peuvent produire des tumeurs, contrairement au vecteur de type EIAV (Themis et al., 2005). Cette étude a cherché où se trouvait le site d'insertion du vecteur dans les cellules tumorales. Dans la moitié des cas, il s'insère proche d'un gène impliqué dans la transcription, la traduction, la prolifération cellulaire ou la réparation de l'ADN qui sont tous potentiellement importants dans le processus d'oncogénèse. Les LVs possèdent, autour de la capsid, une enveloppe présentant à sa surface des molécules lui permettant d'interagir avec cellules que le virus tente d'infecter. Les lentivirus sont pathogènes pour l'humain mais, comme leur nom l'indique (lenti = lent), ils ont une longue période d'incubation. Dans le cadre de ce travail, les virus utilisés ont été modifiés de sorte qu'ils sont dépourvus de la capacité de se répliquer. Les lentivirus permettent de transduire les cellules de manière stable, qu'elles aient ou non la capacité de se diviser. Chez la souris adulte, les vecteurs lentiviraux dérivés de HIV1 transduisent principalement le RPE, ce qui est un avantage car le RPE est essentiel aux photorécepteurs pour leur fonction et leur survie. En effet, les cellules du RPE entretiennent les photorécepteurs en phagocytant les débris de leurs segments externes et en renouvelant du matériel des photorécepteurs (ex : membrane). Lorsque le vecteur est injecté 5 à 10 jours après la naissance, avant que la rétine soit mature, les LVs peuvent aussi cibler des cellules de la neurorétine (la neurorétine est constituée de toutes les cellules qui composent la rétine, à l'exception du RPE). Jusqu'à présent, ce sont surtout des rétines saines qui ont été étudiées (Myoshi et al 1997 ; Kostic et al., 2003, Grüter et al., 2005). Or, on sait que la perte de photorécepteurs modifie non seulement la structure de la rétine, mais entraîne également un changement des molécules exprimées à la surface des cellules rétinienne. Ce qui a pour conséquence de moduler les interactions entre ces cellules. Il est donc possible que cela favorise la diffusion des vecteurs dans la rétine, et ainsi de mieux transduire les cellules rétinienne. Une étude effectuée par Pearson et al. a investigué ces changements à travers la transplantation de photorécepteurs. Pearson et al. se sont intéressés à la membrane limitante externe (OLM), formée par les jonctions serrées entre les pieds des cellules de Müller et les photorécepteurs et visible dès le 5^{ème} jour de vie. Dans la majorité des dégénérescences rétinienne, l'OLM demeure intacte jusqu'à un stade avancé de la maladie mais l'atteinte de l'OLM mène à une gliose réactionnelle (cicatrice) qui elle-même restreint la migration de

photorécepteurs transplantés. Lorsque la rétine dégénère, des changements moléculaires s'opèrent avec notamment l'altération des jonctions serrées entre les pieds des cellules de Müller et les photorécepteurs. Parallèlement, dans les stades avancés de la dégénérescence rétinienne chez les souris *Rho -/-*, l'expression de GFAP (Glial fibrillary acidic protein) par les cellules de Müller augmente, ce qui parle en faveur d'un renforcement de l'OLM par les pieds des cellules de Müller (Calame et al., 2011). La matrice extracellulaire semble prendre le relais pour compenser l'atteinte de l'OLM, avec les molécules CD44, Neurocam et la protéine Crumb. Dans les rétines matures saines, le taux d'intégration de photorécepteurs transplantés est faible par rapport aux taux dans les rétines immatures et certaines rétines matures dégénérées (celles ayant le gène *Crb1* muté). Ils ont supposé que cela pouvait être en partie expliqué par la barrière physique formée par l'OLM. Pearson et al. ont démontré chez des souris saines et chez des souris présentant une dégénérescence rétinienne que détruire sélectivement l'OLM en ciblant les protéines *Crb1* ou *ZO-1*, qui sont essentielles pour former les jonctions serrées, améliore dans les 2 cas la migration des photorécepteurs au travers de la rétine. Au niveau de l'OLM, la dégénérescence rétinienne mène donc d'abord à un accroissement de l'espace intercellulaire et à une meilleure diffusion du vecteur notamment par une altération de *ZO-1* comme l'a montré l'étude de Calame et al. avant qu'une gliose réactionnelle ne rende la rétine moins perméable à la diffusion du vecteur. Les vecteurs AAV transduisent différents types de cellules selon le sérotype de la capsid, le mode d'injection. Le promoteur détermine également si une cellule infectée est capable d'exprimer le transgène. Les types de cellules transduit par le vecteur AAV sont : les photorécepteurs, l'épithélium pigmentaire (RPE), les cellules ganglionnaires, les cellules de Müller, les cellules amacrines, les cellules bipolaires et les cellules horizontales. Les vecteurs LV, eux, ont une enveloppe qui détermine en partie les cellules qu'ils peuvent transduire. Par exemple, chez la souris saine, bien que l'enveloppe VSVG fusionne avec la membrane de toutes les cellules, elle cible presque uniquement le RPE. Comme le RPE a une action de phagocytose, il est postulé que les LV-VSVG ont une plus grande opportunité pour intégrer ces cellules. Ils transduisent aussi les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires, les cellules de Müller et les cellules amacrines, mais seulement en nombre limité (Harvey et al., 2002).

3. Population cible :

Ce travail repose sur un modèle murin ayant les deux exemplaires du gène de la *Rhodopsine* mutés, provoquant un arrêt de la transcription de ce gène. Elles sont appelées souris *Rhodopsine* knock-out, *Rho -/-*. Le choix de cette mutation s'explique par le fait qu'elle entraîne une dégénérescence relativement lente provoquant une perte de tous les bâtonnets à 5 mois de vie. Cela permet d'étudier à divers moments de l'évolution de la maladie la capacité du vecteur d'intérêt à transduire les cellules rétinienne.

4. Intervention / Comparatif :

L'intervention consistera en l'injection dans l'espace sous-rétinien de LV contenant le gène que l'on souhaite transférer. Dans le cas de cette partie du projet, un gène dit «reporteur» codant pour la Green Fluorescent Protein (GFPII) sera utilisé pour être transduit dans les cellules rétiniennes. Au microscope, lorsqu'on l'expose à de la lumière UV, la GFPII devient verte. En regardant où se trouve la fluorescence verte, cela permet de déterminer dans quelle couche cellulaire la transduction a eu lieu et sur quelle distance la transduction s'est faite. L'immunohistochimie indiquera ensuite précisément quels types de cellules ont été transduits en révélant la présence d'antigènes spécifiques à un type de cellule rétinienne. Dans l'acide désoxyribonucléique (ADN), devant chaque gène, il y a une séquence que l'on nomme promoteur. Ce dernier contrôle l'expression de l'ARNm du gène qui le suit. Afin d'être sûr que le vecteur a la possibilité de transduire toutes les cellules dont il en est capable, un promoteur non sélectif (ubiquitaire) contrôlant l'activité du gène Elongation Factor-1 (participe à la synthèse protéique) sera inséré en amont du gène que l'on veut étudier. Les séquences insérées dans le vecteur sont donc le promoteur et le cDNA de la GFPII. Concernant les expériences, le comparatif se fera entre deux types de souris. Le LV sera injecté dans une rétine en dégénérescence et dans une rétine saine. Il y aura donc deux types de souris. L'enveloppe Mokola a été choisie car elle a une forte affinité pour les cellules gliales du cerveau (Pertusa et al, Neurobiol Aging. 2008), ce qui laisse espérer une meilleure transduction des cellules de Müller dans la rétine. Le but à plus long terme serait de faire produire et sécréter par les cellules de Müller un facteur neurotrophique favorisant la survie des photorécepteurs. Dans les rétines en dégénérescence, plusieurs modifications de la structure de la rétine ont été observées, telle l'augmentation de l'espacement entre les pieds des cellules de Müller. En conséquence, il est possible que des vecteurs lentiviraux diffusent un peu mieux ou que des modifications de la membrane de certaines cellules facilitent leur transduction par le LV-Mokola-GFPII. Les témoins utilisés seront des souris d'un âge similaire ayant des rétines saines.

5. Critère de jugement / Outcomes :

A l'aide de la GFPII (Green Fluorescent Protein 2) et de l'immunohistochimie, il s'agira de déterminer dans quel(s) type(s) cellulaire(s) le transgène est exprimé. Nous étudierons une éventuelle amélioration de la diffusion du vecteur dans la rétine depuis le point d'injection qui est effectuée entre la neurorétine et le RPE. Au microscope, grâce à la GFPII, nous mesurerons jusqu'où la fluorescence est présente, ce qui traduit la distance sur laquelle le vecteur a diffusé et quels types de cellules rétiniennes sont transduits. Les cellules positives pour la GFPII seront identifiées par des méthodes d'immunohistochimie en révélant la présence d'antigènes spécifiques à un type de cellule rétinienne.

6. Question de recherche :

Est-il possible, en modifiant l'enveloppe de vecteurs de type Lentivirus, d'augmenter leur diffusion dans la rétine et de transduire différents types de cellules rétiniennes, dont les photorécepteurs ?

7. Répartition du travail :

Les vecteurs ont déjà été construits, les techniciennes produiront les vecteurs, les injecteront et prélèveront les yeux. J'assisterai à toutes ces étapes. Par la suite, je tenterai de produire moi-même un lot de vecteurs. Je prendrai en charge les coupes histologiques au cryostat, ainsi que le marquage immunohistochimique, le comptage et l'analyse au microscope. Nous nous attendons à une meilleure diffusion des vecteurs car comme écrit précédemment, le virus Mokola est capable d'infecter les cellules gliales du cerveau, ce qui permet peut-être de mieux transduire les cellules de Müller. Au cours de l'expérience, un des paramètres le plus à risque de subir une variation entre chaque souris est le diamètre de la bulle engendrée par l'injection sous-rétinienne. Comme la quantité de cellules infectées dépend directement du diamètre de cette bulle (car cela augmente la surface de la rétine exposée au vecteur), il faudra tenir compte de ces variations possibles dans l'analyse des résultats. Les données seront conservées dans un cahier de laboratoire, les échantillons biologiques dans une boîte spéciale, et les résultats seront stockés sur le serveur de l'Hôpital Ophtalmique.

8. Autorisations :

Ce projet est sous l'égide de l'autorisation du vétérinaire cantonal (Vaud) n° 1367.3.

9. Echancier :

- Novembre 2010 : Apprendre à faire l'immunohistologie, les coupes au cryostat et se familiariser avec la littérature de ce domaine de recherche.
- Janvier 2011 : Apprendre la production de virus et 1^{ère} injection de souris (expérience 1).
- Février 2011 : Faire les coupes au cryostat et l'immunologie des rétines de l'expérience 1.
- Mars 2011 : Analyser les résultats de l'expérience 1.
- Septembre 2011 : Poursuite de l'analyse des résultats, revue de la littérature et rédaction.

Méthode :

Sujets d'étude : Deux types de souris constituent les sujets de cette étude : des souris C57BL6 (wild type) et des souris génétiquement modifiées dépourvues du gène codant pour la Rhodopsine (= Rhodopsine knock-out ou Rho -/-). Elles sont nées de l'accouplement de souris provenant du laboratoire où ce travail de recherche a été effectué. Les souris sont élevées en cage à température ambiante dans une pièce fermée simulant le cycle jour/nuit et disposant d'un système de

ventilation assurant une température constante. Elles sont toutes nourries avec une nourriture identique, spécialement adaptée et de l'eau.

Protocole d'injection : 5 mâles (10 yeux) Rho -/- ont été injectés en sous-rétinien avec 2µl/œil (160 ng, 1'100'000 TU, 800'000 vg /œil) à P66 (= 66 jours de vie). Le virus utilisé est un lentivirus ayant une enveloppe Mokola (80'000 ng/ml, 5.6X 10⁸ TU/ml, 4.2X 10⁸ vg/ml), un promoteur EFS (ubiquitaire) et le gène GFPII (Green Fluorescent protein 2). 3 sont morts de cause indéterminée dans les jours qui suivent et 2 (4 yeux) ont été sacrifiés 7 jours post injection (P73). Après avoir été énucléés, les yeux passent 1 heure de PAF (ParaFormAldéhyde) à 20°C, puis sont rincés au PBS (Phosphate Buffered Saline) avant d'être placés dans une solution de sucrose 30% à 4°C pendant au moins une nuit.

5 souris sauvages C57BL6 (2 mâles et 3 femelles, soit 10 yeux en tout) ont été injectées en sous-rétinien avec 2µl/œil (160 ng, 1'100'000 TU, 800'000 vg /œil) à P78. Le virus utilisé est un lentivirus ayant une enveloppe Mokola (80'000 ng/ml, 5.6X 10⁸ TU/ml, 4.2X 10⁸ vg/ml), un promoteur EFS (ubiquitaire) et le gène GFPII (Green Fluorescent protein 2). Les 5 ont été sacrifiées 7 jours post injection (p85). A noter qu'une souris souffrait de microphthalmie d'un œil et donc que 9 yeux ont été prélevés. Après avoir été énucléés, les yeux passent 1 heure de PAF (Paraformaldéhyde) à 20°C, puis sont rincés au PBS (Phosphate Buffered Saline) avant d'être placés dans une solution de sucrose 30% à 4°C pendant au moins une nuit.

Sacrifice et coupes : Quelques minutes après avoir été anesthésiées à l'aide d'éther, les souris sont sacrifiées par traumatisme cervical. Leurs yeux sont ensuite prélevés et conservés dans une solution de glucose à 4°C après avoir créé un petit orifice dans la sclère pour permettre la diffusion de cette solution dans l'œil. Les yeux sont posés sur des supports à -27°C et ensuite recouverts par du yazulla, une substance contenant de l'albumine. Après avoir attendu quelques minutes que le yazulla soit solidifié, l'œil est coupé en fines tranches de 14µm. Les coupes sont réparties sur 6 lames de manière alternée (coupe 1 sur lame 1, coupe 2 sur lame 2, etc.), de sorte que chaque lame soit représentative de l'entier de la rétine. Les lames sont stockées à -20°C en attendant d'être utilisées pour l'immunohistochimie.

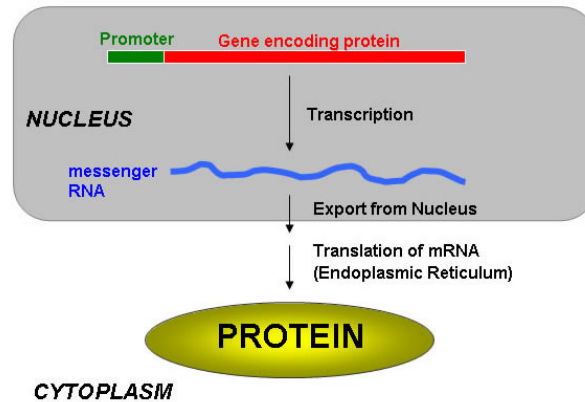
Immunohistochimie : La rétine est composée de plusieurs types de cellules organisées en couches. Chaque type de cellule a des fonctions différentes et exprime certaines protéines qui lui sont relativement spécifiques. Il est possible de mettre en évidence une protéine, donc un type de cellule particulier. Les lames sont d'abord hydratées avec du PBS pendant 5 minutes. Pour cela, deux anticorps sont utilisés. Un premier anticorps (= primaire) qui reconnaît la protéine et un deuxième (= secondaire) marqué par un fluorochrome (petite molécule émettant de la fluorescence lorsqu'on l'expose à une lumière d'une certaine longueur d'onde) et qui a une affinité spécifique contre le premier anticorps. Les anticorps primaire et secondaire ne proviennent pas de la même espèce animale : l'anticorps secondaire provient d'un animal qui a été immunisé contre les antigènes du premier animal. Par exemple, l'anticorps primaire

provient de la souris, et l'anticorps secondaire sera un anticorps de chèvre immunisée contre les antigènes de souris, donc l'anticorps secondaire reconnaîtra l'anticorps primaire. L'anticorps peut cibler une protéine de surface, comme il peut cibler une protéine située à l'intérieur de la cellule, après que des pores aient été créés dans la membrane cellulaire à l'aide d'un agent détergent (Triton X100, abrégé TX). Du Normal Goat Serum (NGS = sérum de chèvre) est utilisé pour bloquer tous les sites sur lesquels les anticorps pourraient aller se fixer de manière non-spécifique. Cela permet de diminuer le « bruit » et d'augmenter le signal de l'anticorps secondaire. Il est important de relever que durant cette recherche, la GFPII a été observée directement de par la fluorescence qu'elle émet. Il n'y a pas en d'utilisation d'un anticorps anti-GFPII.

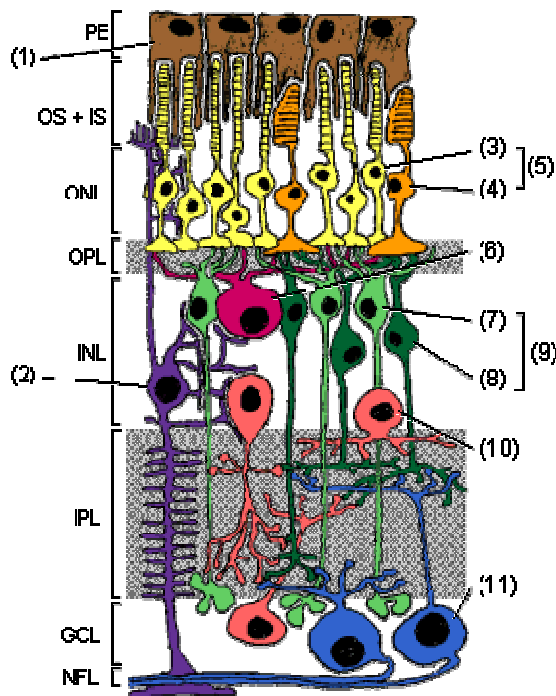
C'est le principe de l'immunohistochimie. Plus précisément, on procède de la manière suivante :

- 1) 3 x 5 minutes de lavage au PBS (Phosphate Buffered Saline) de la lame.
- 2) 1 h 00 d'incubation dans une solution de blocking : TX 0,2%, NGS 10% et PBS à température ambiante.
- 3) Une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (cible la protéine d'intérêt) dans du blocking.
- 4) 3 x 5 minutes de lavage au PBS.
- 5) 1 h 00 avec l'anticorps secondaire (qui se fixe à l'anticorps primaire et qui est marqué par un fluorochrome) dans du PBS à température ambiante.
- 6) 1 x 5 minutes de lavage au PBS.
- 7) 1 x 5 minutes de Dapi (= 4', 6' - diamidino - 2 - phénylindole, marque les noyaux de toutes les cellules).
- 8) Mowiol pour fixer les coupes.

Formation d'une protéine :



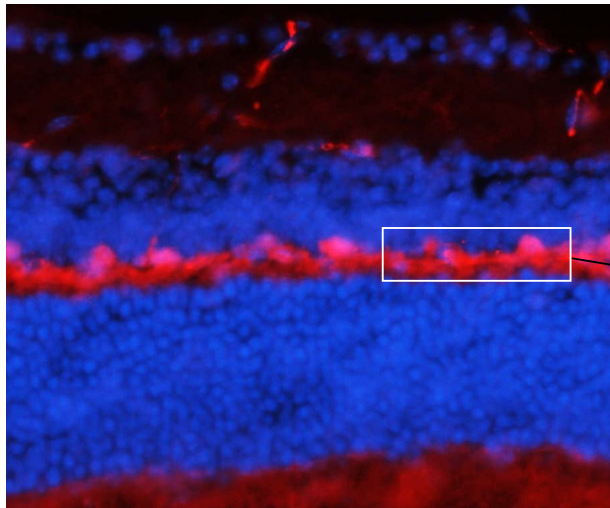
Ci-dessous, l'organisation de la rétine :



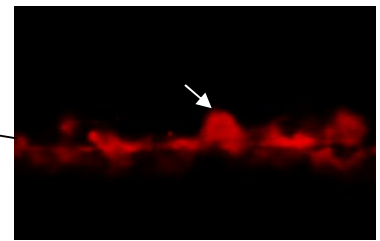
Les chiffres indiquent les types cellulaires suivants : RPE (PE, 1), cellules de Müller (2), photorecepteurs (5): bâtonnets (3) et cônes (4), cellules horizontales (6), cellules bipolaires (9): cellules bipolaires des bâtonnets (7) cellules bipolaires des cônes (8), cellules amacrine (10), cellules ganglionnaires (11). OS : segments externes. IS : segments internes. ONL : couche nucléaire externe. OPL : couche plexiforme externe. INL : couche nucléaire interne. IPL : couche plexiforme interne. GCL : couche des cellules ganglionnaires. NFL : couche des fibres nerveuses. Les flèches jaunes indiquent la direction de la lumière à travers l'œil et les couches de la rétine.

Comme le but du travail est de mettre en évidence certains types cellulaires, voici quelques marquages immunohistochimiques, avec le Dapi en bleu et le marquage spécifique en rouge ainsi que quelques agrandissements des corps cellulaires.

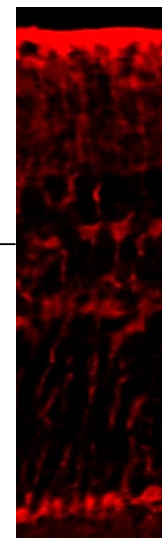
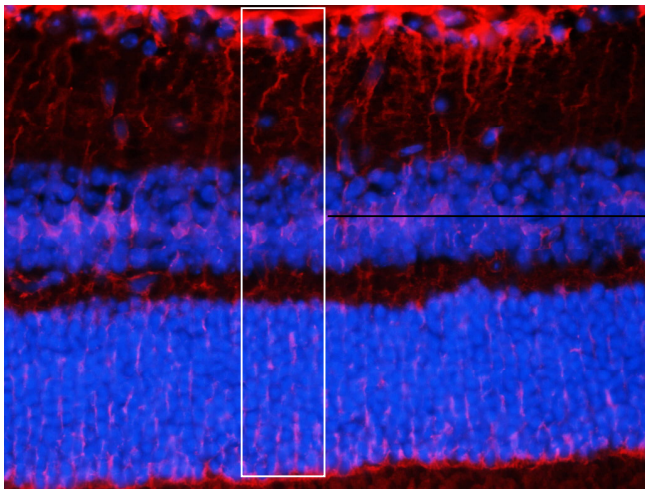
La calbindine, qui marque les cellules amacrines et les cellules horizontales chez l'oeil 6864 FVB WT P15 :



Ci-contre un agrandissement du corps cellulaire d'une cellule horizontale avec ses dendrites



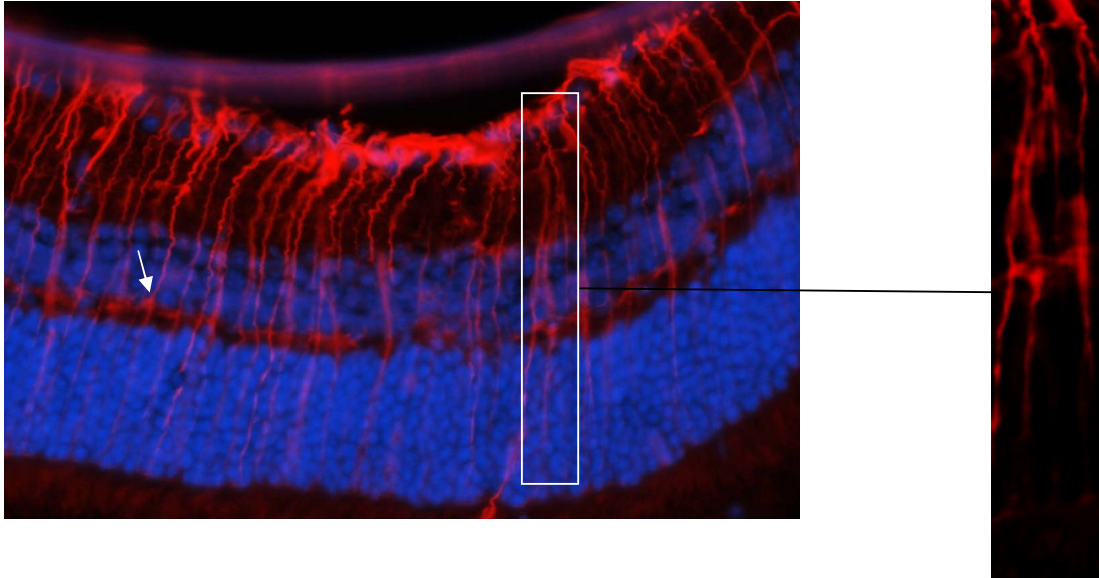
CralBP, qui marque les cellules de Müller (la flèche indique le noyau d'une de ces cellules) et les cellules de l'épithélium pigmentaire chez l'oeil 7060 C57BL6 P85 :



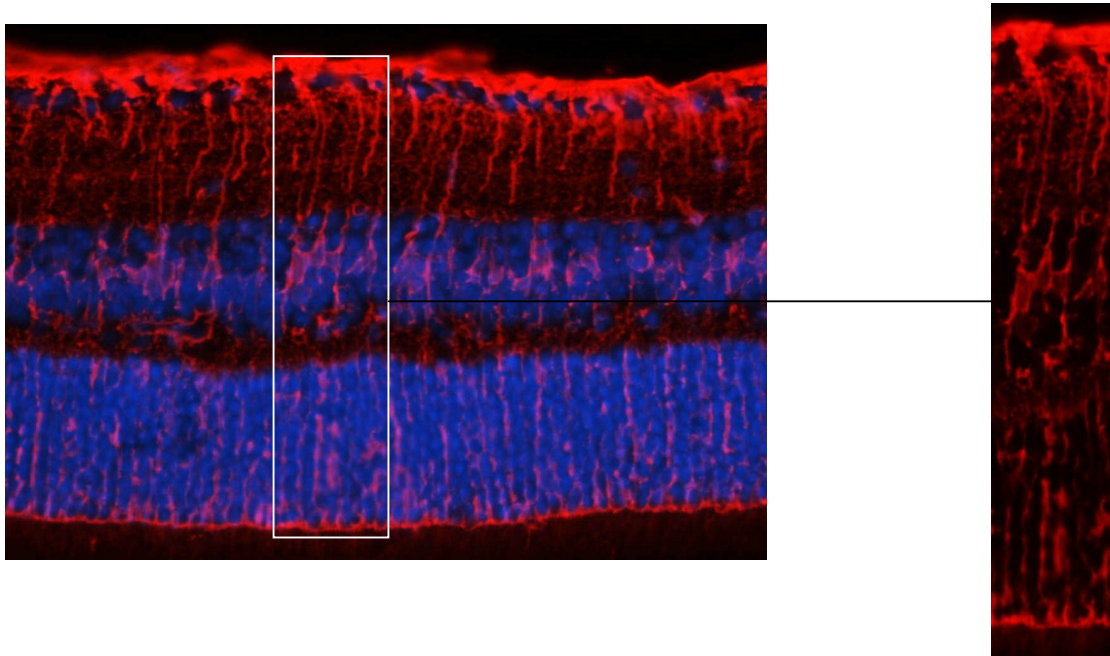
Voici un agrandissement montrant les cellules de Müller

Les noyaux des cellules de Müller sont localisés au niveau de l'INL. Ces cellules ont des prolongements allant au contact des cellules ganglionnaires et au contact des photorécepteurs.

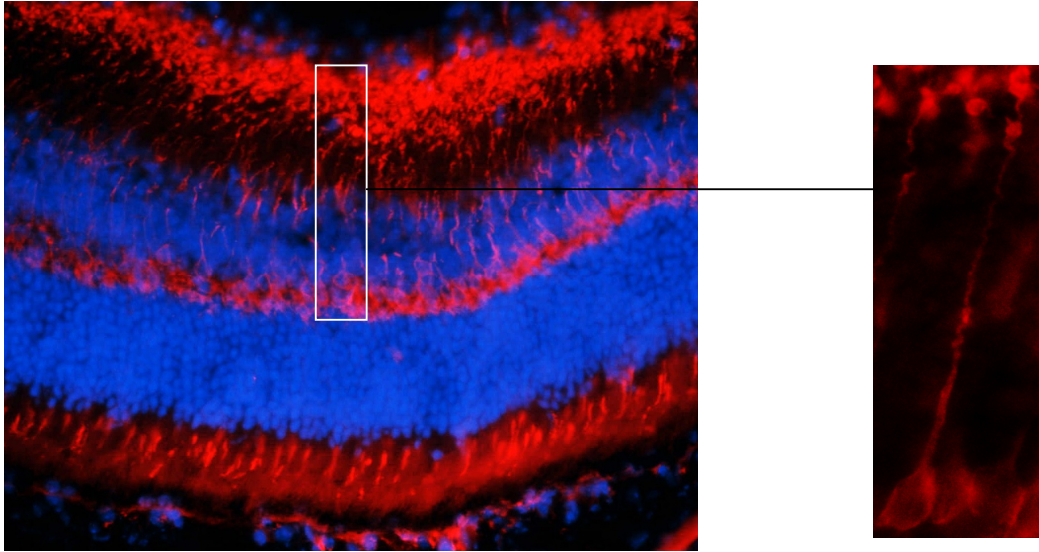
GFAP, qui marque les astrocytes et les cellules de Müller activées (flèche) chez l'œil 7059 C57BL6 P85 :



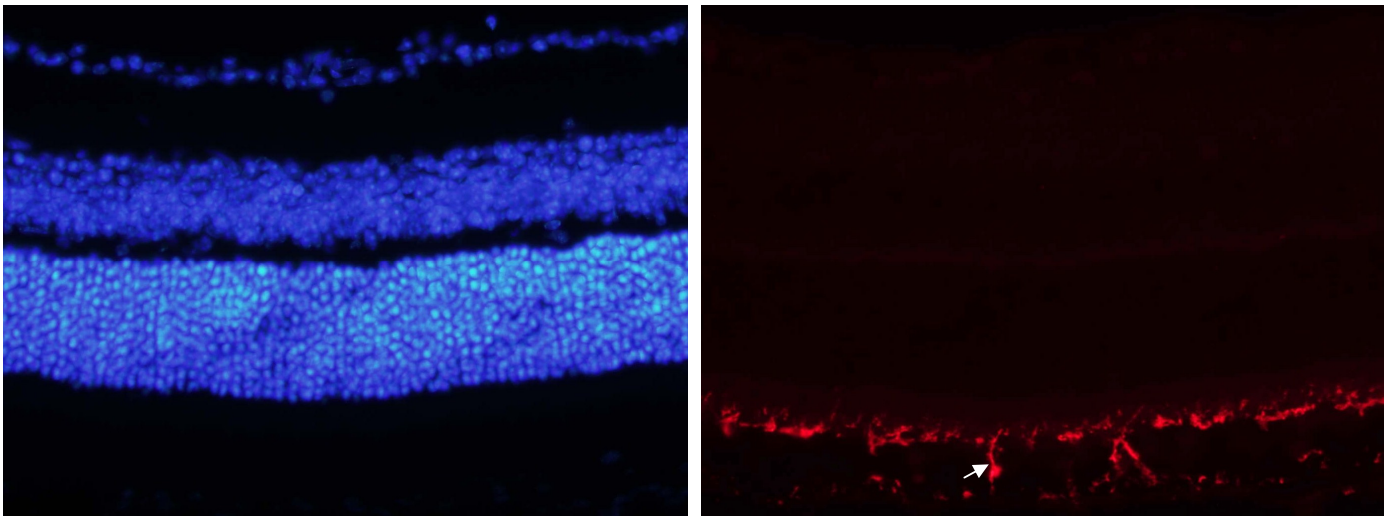
Gs, qui marque les cellules de Müller chez l'œil 7060 C57BL6 P85 :

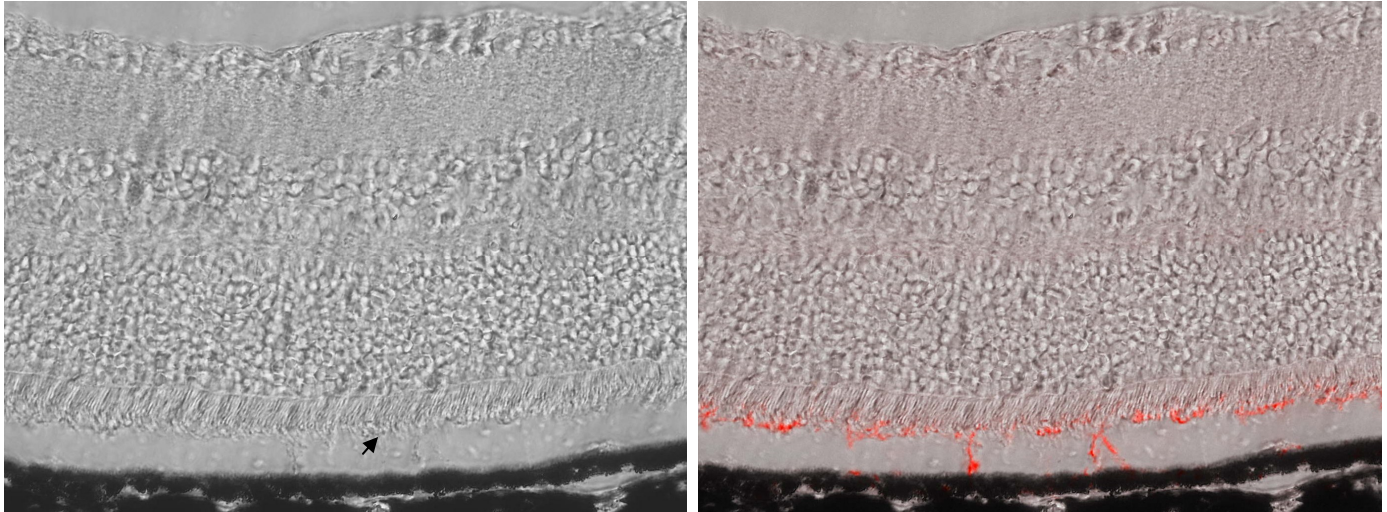


PKC alpha, qui marque les cellules bipolaires des bâtonnets ainsi que les cellules amacrines et les cônes chez l'oeil 6708 FVB WT P79 :

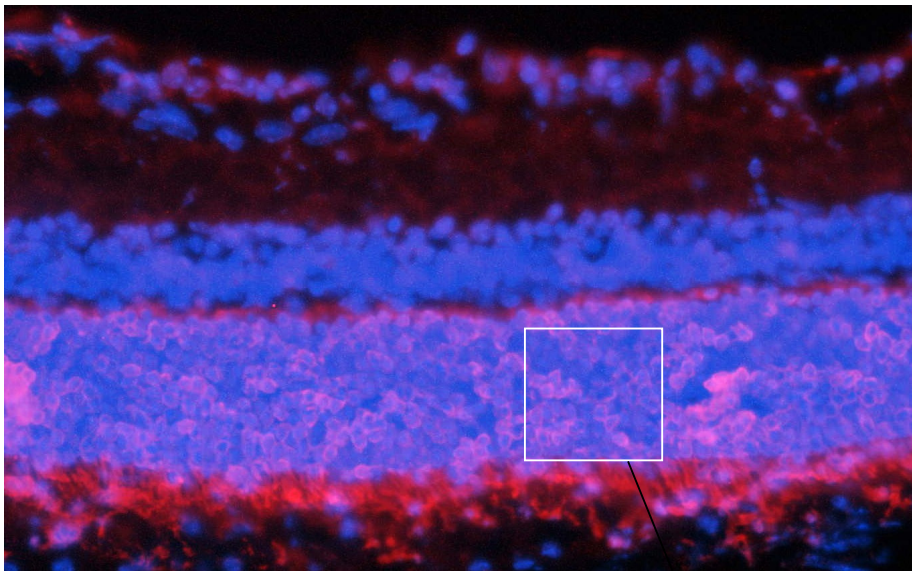


RDS, qui marque les segments externes des photorécepteurs (flèche) chez l'œil 6708 FVB WT P77 :

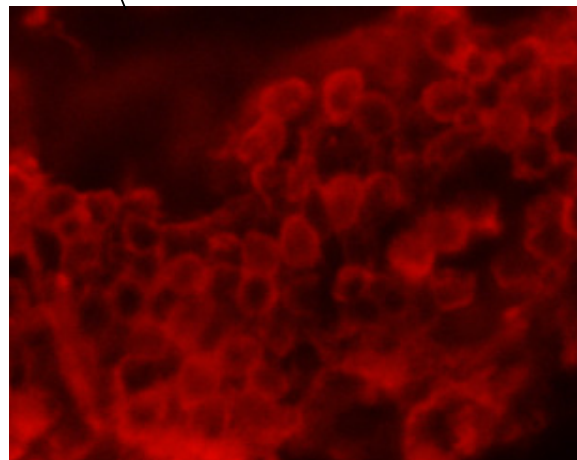




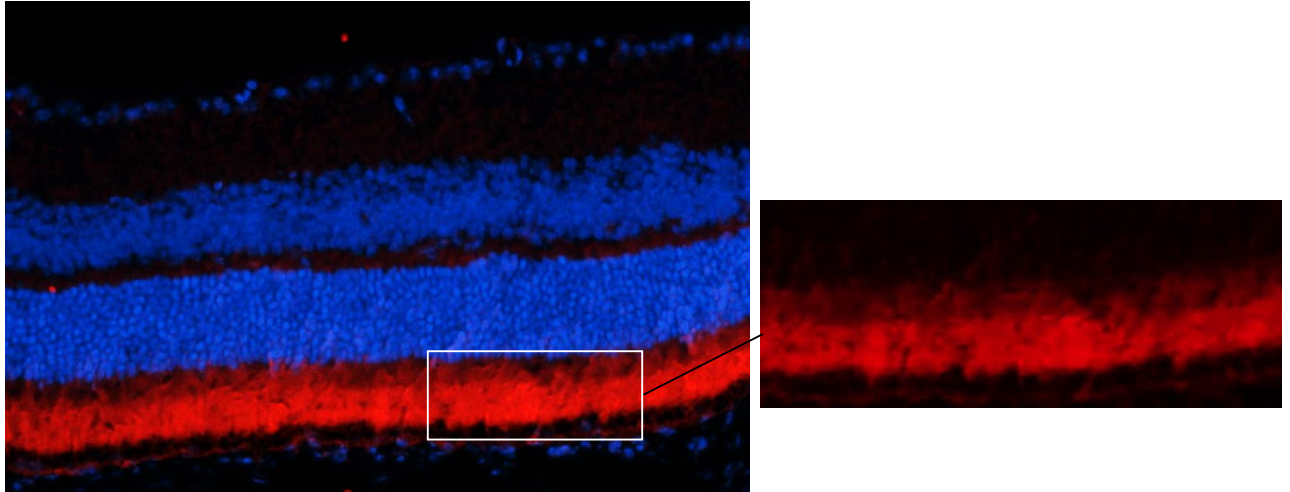
Recoverine, qui marque les photorécepteurs et certaines cellules bipolaires des cônes chez l'œil 7063 C57BL6 P85 :



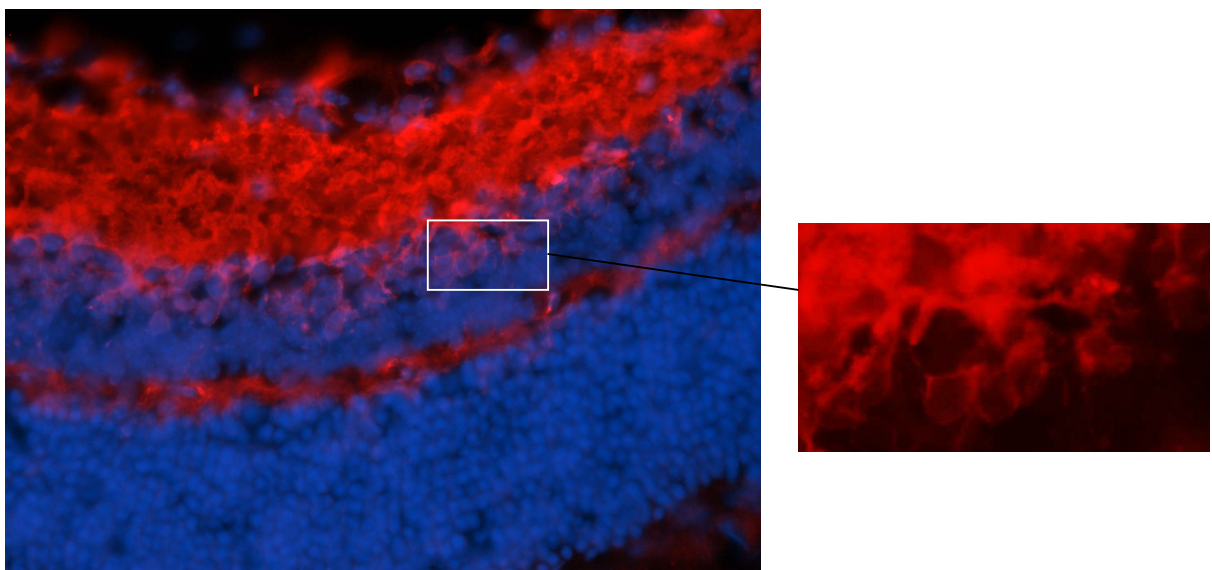
Ici, un agrandissement des corps cellulaires des photorécepteurs.



Ret-P1, qui marque les segments externes des bâtonnets chez l'œil 6234 Rho $-/-$ P77 :



Syntaxine, qui marque les cellules amacrines ainsi que leurs neurites chez la souris 7060 C57BL6 P85 :



Voici un tableau résumant la provenance et la dilution des anticorps :

Nom de l'anticorps	Origine	Lieu de fabrication	Dilution
Calbindine (C2 D-28K)	Souris	Sigma (Saint-Louis USA)	1/1000
CralBP (C16)	Lapin	Jack Saari (Washington USA)	1/1000
GFAP (G3)	Lapin	Dakocytomation (Glostrup Danemark)	1/400
Gs (G8)	Lapin	Sigma	1/5000
PKC alpha (P19)	Souris	Sigma	1/1000
RDS (R4)	Chèvre	Labforce (Nunningen Suisse)	1/100
Recoverine	Lapin	Millipore (Billerica USA)	1/1000
Ret-P1 (R11)	Souris	Thermo Fisher Scientific Anatomical Pathology (Fremont USA)	1/100
Syntaxine (S7)	Souris	Sigma	1/1000

Les anticorps secondaires et leurs longueurs d'ondes:

L'anticorps secondaire est choisi en fonction de l'anticorps primaire que l'on veut cibler et en fonction de la couleur que l'on veut.

Alexa 633 : âne anti-chèvre IgG, produit par Invitrogen à Bâle, dilué à 1/2000, rouge.

Alexa 633 : chèvre anti-souris IgG, produit par Invitrogen à Bâle, dilué à 1/2000, rouge.

Alexa 633 : chèvre anti-lapin IgG, produit par Invitrogen à Bâle, dilué à 1/2000, rouge.

Alexa 488 : âne anti-chèvre IgG, produit par Invitrogen à Bâle, dilué à 1/2000, vert.

Alexa 488 : chèvre anti-souris IgG, produit par Invitrogen à Bâle, dilué à 1/2000, vert.

Alexa 488 : chèvre anti-lapin IgG, produit par Invitrogen à Bâle, dilué à 1/2000, vert.

Alexa 633 : Excitation / absorption : 632nm.
Emission : 647nm.

Alexa 488 : Excitation / absorption : 495nm.
Emission : 519nm.

Production du virus : Il s'agit pour ces deux expériences (souris Rho -/- et wild type) du même virus, à savoir un lentivirus avec une enveloppe Mokola (80'000 ng/ml, 5.6×10^8 TU/ml, 4.2×10^8 vg/ml), un promoteur EFS (ubiquitaire) et le gène GFP2 (Green Fluorescent protein 2). Sa production se déroule sur 7 jours. Avec l'aide d'une laborantine, nous avons procédé de la manière suivante :

Jour 1 : Le contenu d'un flacon de culture de 75cm^2 contenant des cellules de la lignée 293T et ayant environ 80% de confluence est dilué à 1 : 6. Trois flacons de culture de 150cm^2 sont produits. Pour passer (changer le milieu et diluer le virus) les cellules, nous utilisons de la Trypsine pour les décoller. Puis une fois qu'elles sont dans les nouveaux flacons de culture la Trypsine est antagonisée à l'aide d'une solution contenant du nouveau milieu de culture et du sérum de veau fœtal. De la pénicilline et de la streptomycine sont ajoutées pour éviter que des bactéries se développent dans le milieu de culture.

Jour 4 : Les 3 flacons de culture de 150cm^2 sont passés dans 40 boîtes de pétri (2 x 20), chacune de ces dernières recevant 10ml de milieu, soit environ 4 millions de cellules par boîte de pétri. Cela permettra par la suite la production de 2 séries de 7 tubes de préparation virale concentrée. 1 ml est utilisé pour refaire un flacon de culture de 75cm^2 pour la semaine qui suit.

Jour 5 : La confluence est à environ 70%. La solution de transfection est diluée à 1/10 (1ml pour 10ml de milieu). Chaque boîte de pétri contient 1ml de solution de transfection, dont : 500 μ l de HBS 2X(= 200%), 125 μ l de CaCl_2 1M, de l'eau distillée en quantité 375-x, x étant la quantité d'ADN en μ g. On parle ici d'ADN pour caractériser les composés servant à produire le virus, à savoir : une quantité de plasmide de 10 μ g pour le transgène, 5 μ g pour l'enveloppe Mokola et 10 μ g pour la capsid et les autres protéines nécessaires au vecteur (transcriptase inverse, intégrase, protéase, Rev, RRE ; <http://www.invivogen.com/review-lentiviral-vectors>). Il est important lorsqu'on met l'ensemble ADN- CaCl_2 dans le HBS de faire des bulles à l'aide d'une seconde pipette. 1ml de la solution de transfection est déposée goutte par goutte dans chaque boîte de pétri.

Jour 6 : Changement du milieu de transfection.

Jour 7 : Le milieu est collecté et 200ml (20 x 10 μ l) sont filtrés avec des pores d'un diamètre de 22 μ m. Le milieu est distribué dans 6 tubes de 32ml, puis s'ensuit une ultracentrifugation à 20'000 tours/minute (65'000g) pendant 1h30 à 4°C. Le surnageant est aspiré, et le culot, qui contient les particules virales, est resuspendu dans 850 μ l de PBS/0,75% BSA. Cette solution est mise dans la glace pour au moins 45 minutes. Puis le contenu en virus (le culot) de chacun des 6 tubes est mis dans un seul tube et complété avec du PBS/0.75% BSA jusqu'à arriver à 30ml. Le tout est centrifugé pendant 1h30 à 20'000 tours/minute à 4°C. Le surnageant de chaque tube est retiré et 50 μ l de PBS/0.75% BSA servent à resuspendre le culot, qui contient les particules virales. Celui-ci est transféré dans un tube de 1.5ml imprégné de silicone. 4 cycles de centrifugation de 3 minutes sont effectués à 2'000 tours/minute et après chaque cycle seul le surnageant est conservé, le culot étant jeté car il

contient des débris cellulaires (2'000 tours/minute pendant 3 minutes ne suffisent pas à faire précipiter les particules virales). Le surnageant est finalement transféré dans un tube recouvert de silicone. Il est à ce moment là nécessaire de conserver dans un tube recouvert de silicone 2 μ l de virus concentré dans 45 μ l de Triton-X à -20°C pour quantifier par ELISA le nombre de particules virales. 2 μ l de virus concentré serviront à faire le test de répliation sur des cellules 208F (fibroblastes de rat). Le test de répliation doit normalement être négatif. Enfin 3 μ l servent à faire le titre infectieux (1 tube à -20°C pendant une nuit). Le reste du concentré de virus, soit 10.2 μ l, est réparti dans des tubes recouverts de silicone et stockés à -80°C.

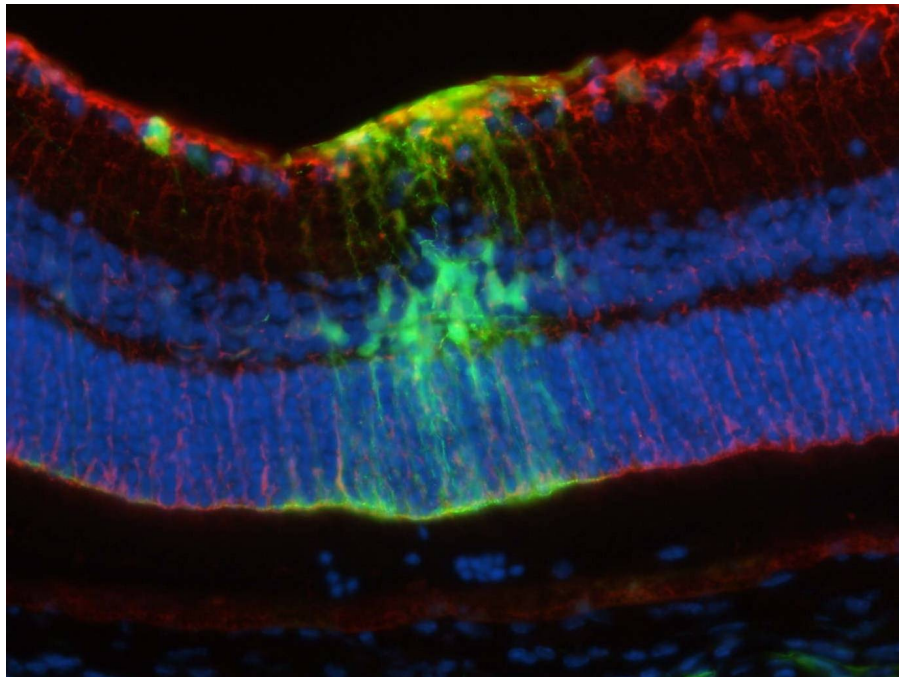
Test de répliation : Ce test vise à s'assurer que le virus utilisé n'a pas la capacité de se répliquer une fois qu'il a infecté les cellules. Pour cela la solution contenant le virus est incubée 2 fois avec des cellules 208F (fibroblastes de rat) et une fois avec des cellules P4 (cellules humaines cancéreuses de l'utérus). Afin d'éviter les faux positifs, le milieu est filtré pour enlever les débris cellulaires dans le surnageant. Le test de répliation consiste à déposer dans 2 puits des cellules 208F et dans un 3^{ème} puit des cellules P4. Du concentré de virus est déposé dans le premier puit. Après une semaine, le surnageant du premier puit est déposé dans le second puit. Après 3 jours (jour 10), le surnageant du 2^{ème} puit est mis dans le 3^{ème} puit. Le 13^{ème} jour, une coloration par X-gal (colore la β -galactosidase dont l'expression est induite par la recombinaison du virus et signe la capacité répliative du virus) vise à révéler indirectement la recombinaison du virus. En temps normal, le virus devrait avoir infecté les cellules du premier puit, éventuellement du 2^{ème} puit s'il en reste dans le surnageant du 1^{er} puit. Mais les cellules des 2 premiers puits ne devraient pas avoir produit de particules virales étant donné que le virus ne contient pas l'information génétique (le gène de la protéine TAT) lui permettant de se répliquer. Donc il ne devrait y avoir aucune particule virale dans le surnageant des cellules P4. Les cellules normales n'expriment pas la protéine β -galactosidase LacZ. Le virus, s'il s'est recombéné, va exprimer la protéine TAT, qui va aller se fixer sur le promoteur de LacZ, ce qui va amener à l'expression dans le cytoplasme de LacZ. C'est cette expression de LacZ qui est détectée par le test de répliation. Les cellules P4 ne devraient pas exprimer la β -galactosidase LacZ ni se colorer car le virus, même s'il les a infecté, ne devrait pas s'être recombéné. Le test de répliation indique donc si le virus est ou non recombinant, mais n'informe pas sur la présence de virus non recombinant. Donc la recombinaison incorpore TAT dans le génome viral et donne la capacité au virus de se répliquer, ce qui se manifeste par l'expression de LacZ et une coloration bleue.

Résultats : Le but de cette étude a été de déterminer la capacité d'un vecteur lentiviral avec une enveloppe Mokola et un promoteur EFs à transduire une rétine dégénérée et une rétine saine. Pour cela, 5 souris mâles possédant une mutation du gène de la rhodopsine ont été injectées en sous-rétinien à P66 et sacrifiées 7 jours plus tard, à P73. 3 d'entre-elles sont mortes de cause indéterminée dans les jours qui suivirent l'injection (probablement suite à des stress dus à des travaux à proximité de l'animalerie). 5 souris sauvages C57BL6

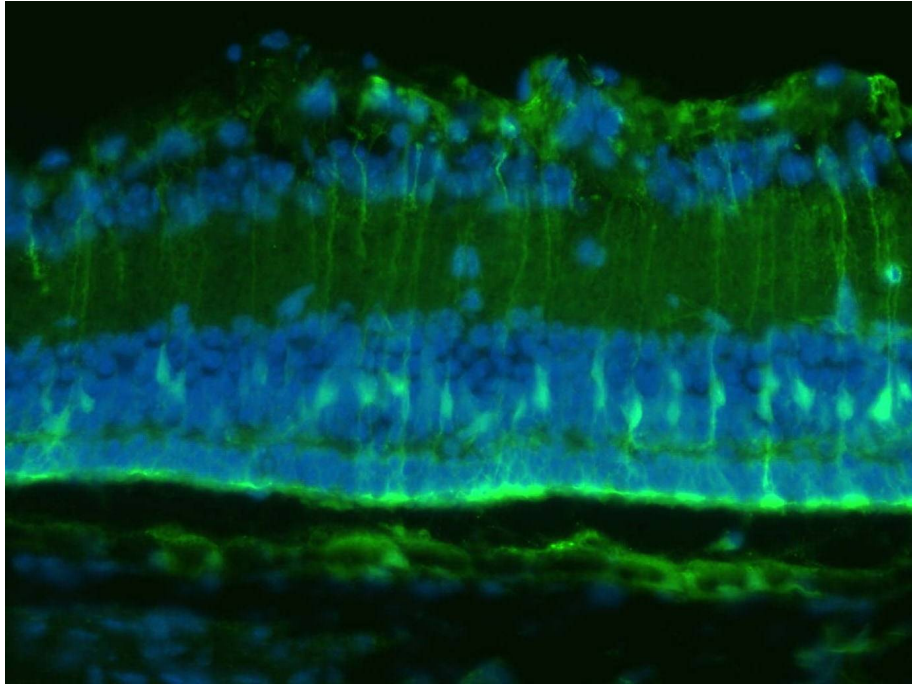
(2 mâles et 3 femelles) ont été injectées en sous-rétinien à P78 et sacrifiées 7 jours plus tard, à P85. Aucune de ces dernières n'est morte durant ces 7 jours. A l'aide d'un microscope à fluorescence, les coupes des yeux injectés ont été analysées en plusieurs temps : tout d'abord, il a fallu identifier les cellules infectées par le virus et donc qui expriment la GFP. Pour cela, il a fallu superposer les photos en Dapi (marque les noyaux des cellules en bleu) et les photos de l'expression de la GFP (sous une lampe bleue dont la longueur d'onde est de 495 nm). Il est ainsi plus aisé de localiser dans quelles couches de la rétine des cellules ont été transduites, et donc d'inférer de quels types de cellules il s'agit en identifiant la couche cellulaire et la morphologie. L'utilisation d'un anticorps pour cibler spécifiquement un type de cellules, par exemple la Gs en rouge pour les cellules de Müller, permet par le double marquage (rouge et vert) d'augmenter le degré de certitude dans l'identification des cellules transduites.

Voici quelques exemples de superposition de photos :

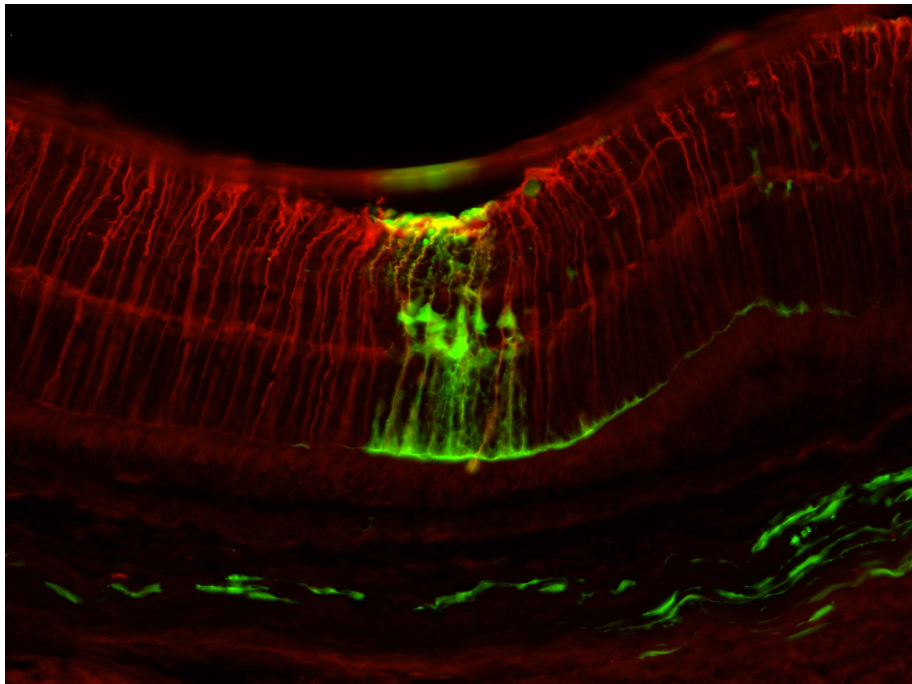
La GFP avec l'anticorps Gs et le Dapi chez une souris C57BL6 à P85 :



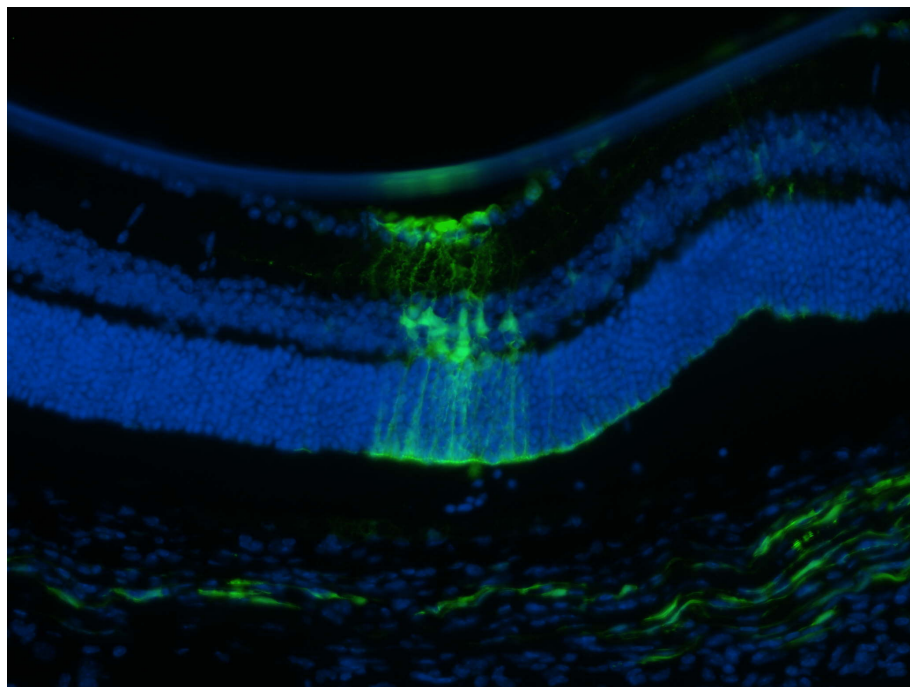
La GFPII et le Dapi chez une souris Rho $-/-$ à P73 :



La GFPII avec l'anticorps GFAP chez une souris C57BL6 à P85 :



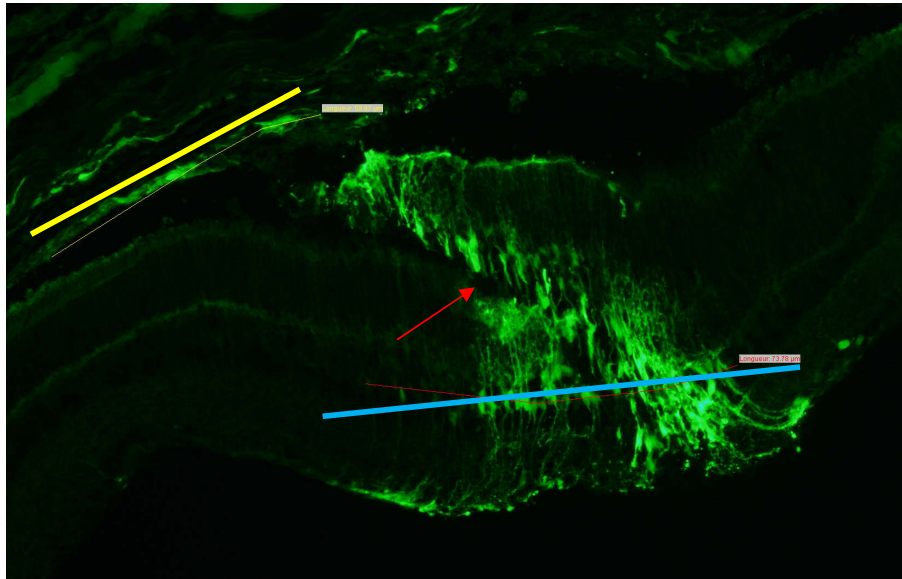
La GFPII avec le Dapi chez une souris C57BL6 à P85 :



Concernant les mesures, des photos ont été prises à l'aide d'un microscope couplé à une lampe au mercure et avec des filtres permettant de mettre en évidence la fluorescence. Sur ces photos, à l'aide du logiciel Cell-P, deux types de mesures ont été effectués : la longueur de RPE exprimant la GFPII a été mise en comparaison avec la longueur de la neurorétine (= toute la rétine sauf le RPE) exprimant la GFPII. Quatre yeux exprimaient suffisamment de GFPII pour que des mesures puissent être effectuées. Une lame de chaque œil a été utilisée. Sur chaque lame, toutes les coupes exprimant la GFPII ont été mesurées. Les résultats en μm reflètent la moyenne des mesures effectuées sur chaque lame :

Type de souris	Numéro de l'oeil	Neurorétine en μm	RPE en μm
Rho -/-	6995	233	308
Rho -/-	6997	67	140
C57BL6	7059	72	68
C57BL6	7062	22	0
C57BL6	7065	42	57

Ci-dessous, un exemple de la façon de procéder pour les mesures : il s'agit de l'œil 7059 provenant d'une souris C57BL6 et injecté avec le lentivirus décrit précédemment. La flèche rouge indique le tracé de l'aiguille au niveau du site d'injection. La ligne jaune montre la distance sur laquelle le RPE a été transduit et exprime la GFPII et la ligne bleue la distance sur laquelle la rétine a été transduite. Ces distances ont été mesurées sur chaque coupe de chaque œil. Puis la moyenne pour chaque œil a été calculée et entrée dans le tableau ci-dessus.



Analyse des résultats et discussion :

L'analyse des résultats consiste à analyser et à comparer les données obtenues chez les deux types de souris C57BL6 (sauvage) et Rho $-/-$ transduits par le même virus (lentivirus avec l'enveloppe Mokola et le promoteur EFS). Le promoteur EFS est ubiquitaire, c'est-à-dire qu'il peut être exprimé dans toutes les cellules. Il a donc été choisi afin d'identifier quels types de cellules l'enveloppe Mokola permettait de transduire. Les critères d'analyse sont les suivants : la distance longitudinale depuis le point d'injection où des cellules expriment la GFPII et la distance transversale depuis le point d'injection où se trouvent des cellules positives pour la GFPII (la diffusion du vecteur dans l'épaisseur de la rétine), le nombre et le type de cellules exprimant la GFPII. Les types de cellules transduites par ce vecteur sont principalement des cellules du RPE et des cellules de Müller. La distance sur laquelle le RPE est transduit détermine la taille de la bulle d'injection alors que la distance sur laquelle la neurorétine est transduite détermine la capacité du vecteur à diffuser dans la rétine.

Comme mentionné précédemment, le double marquage permet d'identifier le type de cellule transduit par co-localisation de la GFPII (émet de la fluorescence verte) avec une fluorescence émettant une autre longueur d'onde (donnant du rouge par exemple). Le Dapi permet de savoir dans quelle couche de la rétine se trouve la cellule transduite. Enfin, la morphologie aide à reconnaître la cellule. Par exemple, une cellule exprimant la GFPII et reconnue par l'anticorps anti-Gs,

qui a son noyau au niveau de l'INL et qui envoie des prolongements dans toute l'épaisseur de la rétine est une cellule de Müller.

Dans l'expérience réalisée ici la neurorétine est transduite uniquement autour du trajet de l'aiguille au travers de la rétine chez les souris C57BL6 et aussi au niveau du décollement rétinien causé par l'injection chez les souris Rho -/-. Pour les deux types de souris, le RPE est transduit dans la zone de décollement. Cela permet d'affirmer que l'enveloppe Mokola cible spécifiquement les cellules RPE dans les rétines saines. La GFPII est exprimée dans le RPE sur une plus grande distance longitudinale depuis le point d'injection que dans la neurorétine chez la souris Rho -/- et sur une distance légèrement supérieure dans le RPE chez la souris sauvage (C57BL6). Dès lors, étant donné que les injections ont été effectuées chez des souris P66 Rho -/- et P78 C57BL6 avec un promoteur ubiquitaire, ces résultats pourraient être expliqués par l'accroissement du niveau d'activité métabolique du RPE lorsque la rétine dégénère comme Grüter et al. l'ont observé. La distance depuis le point d'injection sur laquelle on retrouve de la GFPII exprimée semble être sensiblement plus grande chez les souris Rho-/- que chez les souris C57BL6 tant au niveau de la neurorétine que du RPE. L'accroissement de l'espace intercellulaire, qui favoriserait la diffusion des vecteurs dans la rétine et donc la transduction des cellules rétinienne comme Pearson et al. l'ont supposé, pourrait en être la cause. Concernant la diffusion transversale (dans l'épaisseur de la rétine), il n'y a pas de différence significative entre les souris C57BL6 et les souris Rho -/-. La transduction ne semble pas atteindre l'entier de l'épaisseur de la rétine. En effet, les cellules les plus internes exprimant la GFPII sont les cellules bipolaires, situées dans la couche nucléaire interne et ont été probablement atteintes grâce à la brèche dans la rétine causée par l'aiguille lors de l'injection. Ce sont donc des artefacts liés à la méthode d'injection.

Pourquoi un vecteur lentiviral avec une enveloppe Mokola :

Un vecteur lentiviral avec un promoteur ubiquitaire et une enveloppe VSV-G cible principalement le RPE (Kostic et al., 2003 ; Miyoshi et al., 1997). Ce vecteur a les mêmes capacités de diffusion dans une rétine saine comme dans une rétine atteinte (Calame et al., 2011). Par contre, la capacité du vecteur pseudotypé avec l'enveloppe Mokola de transduire les cellules de Müller est bien plus grande lorsque la rétine est dégénérée. Et dans une rétine saine, cette enveloppe cible spécifiquement le RPE (les seules cellules de Müller transduites sont celles situées au niveau du point d'injection). Mais un plus grand nombre d'animaux traités est nécessaire pour confirmer ces premières observations.

L'enveloppe Mokola interagit avec le récepteur à l'acétylcholine, ce qui explique qu'il cible les cellules gliales (dont les cellules de Müller sont un sous-type) et le RPE (Auricchio et al., 2001 ; Bemelmans et al., 2005 ; Tyler et al., 1996). L'intérêt d'utiliser un vecteur lentiviral avec l'enveloppe Mokola et le promoteur EFS dans les dégénérescences rétinienne est de cibler spécifiquement les cellules de Müller (et le RPE), comme l'a confirmé ce travail de Master. Le promoteur EFs permet une forte expression du transgène. Le but final est de faire sécréter par les cellules gliales des protéines thérapeutiques (protéine fonctionnelle ou facteurs neurotrophiques) pour augmenter la survie des photorécepteurs lors de dégénérescences rétinienne (Dorrell et al., 2009).

Transduire les cellules de Müller permet d'assurer des concentrations supérieures du transgène dans la rétine par rapport à la transduction des cellules du RPE. En effet, il existe dans l'œil un flux liquidien constant allant du corps vitré vers la choroïde, qui est une tunique vasculaire sise à l'extérieur de la rétine. En faisant sécréter la protéine thérapeutique par le RPE, celle-ci atteindrait la neurorétine dans des concentrations moins optimales car elle doit se déplacer à contre-courant de ce flux. De plus, les cellules de Müller occupent toute l'épaisseur de la rétine. En leur faisant sécréter des facteurs neurotrophiques, cela permet potentiellement de cibler tous les types de cellules composant la rétine.

Perspectives du vecteur LV-Mokola : cibler l'angiogénèse lors des dégénérescences rétinienne :

Une application possible de la thérapie génique est de traiter certaines conséquences des dégénérescences rétinienne, comme par exemple la néovascularisation de la rétine. Celle-ci a lieu lors certaines maladies fréquentes, comme la forme humide de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la rétinopathie diabétique proliférative. Ces 2 maladies sont d'origine multifactorielle et mènent à la cécité en partie suite à la prolifération de vaisseaux sous et dans la rétine respectivement. Dans ce cadre là, le but des thérapies antiangiogéniques est de cibler une des 2 étapes clés de la néoangiogénèse, la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Das et McGuire, 2003 ; McLeod et al., 1987, 1996). De multiples altérations microvasculaires engendrent un manque d'apports en oxygène (hypoxie) à la rétine. Les cellules hypoxiques se mettent alors à sécréter une molécule, le HIF-1 (Hypoxia inducible factor 1). Cette molécule va aller se lier à l'ADN et entraîner la production de facteurs de croissance : VEGF principalement, IGF-1 et Ang2. Lors d'hypoxie, VEGF est sécrété par différentes cellules, dont les cellules de Müller et les cellules ganglionnaires (Aiello et al., 1995). Ces 2 maladies sont basées sur une dégénérescence de la rétine qui mène à une cicatrice formée de cellules gliales ou gliose. Les cellules endothéliales, qui forment la couche interne de la paroi des vaisseaux, ont besoin de glie active pour pousser. Ces cellules gliales sécrètent des facteurs dits proangiogéniques favorisant la croissance de nouveaux vaisseaux pour mieux oxygéner la rétine en dégénérescence. Les cellules de Müller sont des cellules gliales, d'où l'intérêt de cibler ces cellules avec le Mokola pour leur faire exprimer des facteurs anti-angiogéniques et/ou des facteurs neurotrophiques (Otani et al., Dorrell et al., 2009, Pertusa et al., 2008). De plus, la déplétion en microglie inhibe de manière significative la formation de nouveaux vaisseaux (Ritter et al., 2006). Transformer les cellules de Müller par transfert de gènes pour sécréter des facteurs anti-angiogéniques apparaît donc comme une stratégie prometteuse pour diminuer les effets néfastes des néovaisseaux. Les résultats de ce travail montrent que le vecteur lentiviral pseudotypé avec l'enveloppe Mokola et possédant le promoteur EFs est idéal pour atteindre cet objectif puisqu'il transduit préférentiellement les cellules de Müller activées (et le RPE) dans les rétines en dégénérescence (Calame et al., 2011). Sur la base de ces mesures, ce vecteur permettrait ainsi de ralentir voire supprimer la néoangiogénèse. Un argument supplémentaire pour utiliser ce vecteur est comme mentionné précédemment le flux liquidien constant allant du vitré vers la choroïde. Faire

sécréter des facteurs anti-angiogéniques par les cellules de Müller permettrait d'atteindre des concentrations plus élevées localement au niveau des vaisseaux qui poussent sur la rétine, avec comme bénéfice escompté de réduire au minimum les taux de protéines thérapeutiques pour arriver à un effet bénéfique. Il existe de multiples gènes candidats à la thérapie génique antiangiogénique (Mori et al., 2002 ; Murata et al., 2000). Actuellement, les travaux de recherche se concentrent principalement sur les anti-VEGF. Une possibilité consiste à insérer dans un vecteur le gène de la molécule anti-VEGF, par exemple le récepteur soluble au VEGF FLT-1, à la suite de la séquence qui lie HIF-1. Ainsi, le gène anti-VEGF se trouve sous contrôle de HIF-1. Lorsque l'environnement est hypoxique, l'anti-VEGF est transcrit, empêchant l'action du VEGF induit naturellement par HIF-1.

Parallèlement aux progrès de la thérapie génique persistent 2 problèmes qui lui sont inhérents : la sélectivité et la dissémination du vecteur viral. Il s'agit d'essayer de ne cibler que les nouveaux vaisseaux anormaux (ils manquent d'étanchéité et causent un œdème de la rétine) et pas les néovaisseaux normaux ni les vaisseaux matures tout en évitant que le vecteur ne parte ailleurs dans l'organisme. L'intérêt de choisir la thérapie génique plutôt que l'injection systémique d'une molécule déjà formée est de garantir une concentration suffisante de la molécule thérapeutique au niveau des cellules cibles sans avoir à réitérer les injections et d'éviter une dissémination systémique du facteur anti-angiogénique à cause des effets indésirables sur les autres organes (van Wijngaarden et al., 2005). Bien que la rétine appartienne au système nerveux central et soit théoriquement hors de portée de la circulation systémique et du système immunitaire, il est en effet possible que lors de l'injection un petit vaisseau soit lésé et qu'une infime partie du facteur anti-angiogénique s'en aille dans la circulation systémique. Actuellement, l'Avastin, un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF injecté directement dans la rétine, est sujet à ce type de problème. Une infime fraction part dans la circulation systémique, mais aucun effet néfaste n'a pour l'heure été observé. Cependant, des problèmes cardiovasculaires pourraient se développer en raison de son effet systémique sur les vaisseaux. Un autre risque est le développement d'anticorps dirigés contre le vecteur pouvant le neutraliser. Cependant, ceux-ci n'auront d'influence que sur une nouvelle injection du vecteur. Le transgène, qui vise à reproduire une molécule endogène à l'organisme peut engendrer une réaction auto-immune contre la protéine thérapeutique et contre la protéine endogène, comme en témoigne les résultats de l'étude menée par Gao et al. en 2004 avec le gène de l'EPO. Quant à la technique d'injection du vecteur, elle présente des risques d'hémorragie sous-conjonctivale, de décollement ou de déchirure de la rétine du fait de sa fragilité. Ces effets indésirables n'ont pas (ou faiblement) été observés sur les coupes chez les souris C57BL6 et Rho $-/-$ lors de ce travail. En revanche, 3 souris Rho $-/-$ sont mortes de cause indéterminée dans les jours qui suivirent l'injection (probablement dus au stress et aux variations de température pendant des travaux de transformation) et une souris C57BL6 souffrait de microphthalmie. La minutie du geste notamment chez la souris expose au risque que l'injection soit suboptimale en termes de localisation. Lors de ce travail, sur les 13 yeux injectés (4 Rho $-/-$ et 9 C57BL6) qui ont été prélevés afin d'être analysés, seuls 5 yeux (2 Rho $-/-$ et 3 C57BL6) exprimaient

de la GFPII. Ceci montre bien les difficultés à obtenir une injection efficace du vecteur. Les injections intravitréennes de molécules anti-angiogéniques peuvent engendrer des uvéites (avec ou sans infection) (Jamrozy-Witkowska et al., 2001). Le délai entre l'injection et l'expression à des concentrations thérapeutiques du transgène constitue une limite supplémentaire dans l'efficacité du transgène à stabiliser la maladie. En effet, durant ce laps de temps, la dégénérescence continue à progresser. Actuellement, il existe des vecteurs qui ont une expression rapide tels le lentivirus et les AAV2/4, 5 et 6 auto-complémentaires (Auricchio et al., 2001 ; Surace et al., 2008).

Réguler l'expression du transgène : Lors de ce travail, l'accent n'a pas été mis sur la régulation de l'expression du transgène, mais uniquement sur les capacités d'un virus avec une enveloppe et un promoteur spécifique à transduire une rétine saine et une rétine dégénérée. Afin d'optimiser les résultats de la thérapie génique, il est primordial de réguler l'expression du transgène en terme de concentration et au niveau temporel. Toutes les molécules ont une fenêtre de concentrations thérapeutiques, c'est-à-dire un effet thérapeutique et une absence d'effets indésirables (Baum et al., 2003). Le site d'insertion du transgène module tous les aspects de l'expression du transgène, dont la durée et le niveau d'expression. Et comme mentionné précédemment, un défaut des vecteurs lentiviraux est de s'insérer à un endroit imprévisible dans le génome des cellules qu'ils transduisent, créant un risque de développer une tumeur. La concentration de la molécule thérapeutique codée par le transgène influence la survie des cellules rétinienne. Pour cela, il est possible de placer le transgène sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité n'est inductible que par une molécule externe au corps humain (Clackson, 2000 ; Pollock et al., 2000 ; Rivera et al., 1996) : par exemple, la rapamycine a la capacité de reconstituer un facteur de transcription qui se lie ensuite à un promoteur pour activer l'expression d'un gène thérapeutique. Le niveau d'expression du transgène est dépendant de la dose injectée de cette molécule externe (la rapamycine) régulatrice de l'expression du transgène (Lebherz et al., 2005 ; Auricchio, Rivera, et al., 2002). La voie d'administration du vecteur influence elle-aussi le niveau d'expression du transgène (valeurs plus élevées si injection est faite en sous-rétinien car meilleure transduction qu'avec une injection intra-vitréenne). Lors de l'étude de Lebherz et al., des concentrations trop élevées de la molécule thérapeutique (la Rapamycine) ont engendré une perte de poids ainsi qu'une souffrance hépatique (élévation des transaminases). Il faut donc réguler les taux du transgène et des molécules régulatrices de son expression. Au cours de ce travail, le taux d'expression de la GFPII n'a pas été mesuré. Cependant, elle était clairement exprimée dans les cellules étudiées à 7 jours post-injection.

Conclusion et limites :

Les résultats de ce travail montrent une transduction plus grande du RPE que de la neurorétine chez les souris C57BL6 et chez les souris Rho -/- par le vecteur lentiviral pseudotypé avec l'enveloppe VSV-G. En ce qui concerne le vecteur lentiviral avec l'enveloppe Mokola, il transduit une surface substantielle de la neurorétine en ciblant les cellules de Müller seulement dans une rétine en dégénérescence (souris Rho -/-). Ainsi, il existerait une relation plus ou moins linéaire entre le degré de dégénérescence de la rétine et le nombre de cellules de

Müller qu'il est possible de transduire. Ces données vont dans le sens de l'étude effectuée par Calame et al. (2011) avec un vecteur similaire mais contenant un autre promoteur ubiquitaire (CMV). Lors de la dégénérescence rétinienne, les cellules de Müller participent à la gliose et deviennent actives. Cela pourrait participer avec les altérations de l'OLM (Campbell et al, 2007) à l'augmentation des capacités de l'enveloppe Mokola à transduire les cellules de Müller.

Ce travail comporte certaines limites : il se base sur 5 yeux (2 Rho -/- et 3 C57BL6), ce qui suffisait pour dire que les résultats vont dans le sens d'autres études, mais insuffisant pour tirer des conclusions en se basant uniquement sur ces données. En comparaison avec d'autres vecteurs utilisés au laboratoire (cf. l'étude de Calame et al. de 2011), on peut dire que dans ce travail de recherche, la diffusion du vecteur dans la rétine fût suboptimale. En effet, les autres vecteurs transduisent une partie de la rétine nettement plus importante que celui utilisé dans le cadre de ce travail. Une autre limite fût la non-disponibilité d'anticorps anti-GFP2 car l'intensité de la GFP2 exprimée tant chez les souris C57 que chez les souris Rho -/- est relativement faible. Ces anticorps auraient permis d'augmenter l'émission de fluorescence et d'accroître l'objectivité dans l'appréciation des mesures. De ce fait, il était parfois difficile de déterminer si une cellule exprimait de la GFP2, d'autant plus que les souris Rho -/-, pour une raison indéterminée, avaient une autofluorescence marquée en comparaison aux souris C57BL6. Ainsi, il fût plus difficile de faire des images de qualité chez les souris Rho -/-. Cependant, au vu des résultats comparables à ceux obtenus par Calame et al. sur un plus grand nombre de souris et le fait qu'ils n'aient pas rencontré ces difficultés lors de leurs mesures conforte la relative exactitude de nos résultats.

Perspectives :

Le domaine de la thérapie génique est actuellement en plein essor mais de multiples barrières demeurent à ce jour. Il y a pour l'instant encore peu de recul sur l'efficacité et la sûreté à long terme de la thérapie génique, mais elle a déjà permis à des enfants atteints de mutations génétiques congénitales de survivre et d'améliorer leur qualité de vie (Maguire et al. ; Ali et al. ; Hauswirth et al. ; Bennett et al. ; Chung et al., 2009). Dans la plupart de dégénérescences rétiniennes, une mutation unique est en cause. Cependant, parfois, il n'y a pas une mutation unique qui cause une maladie unique : la même perte de vision peut être engendrée par des mutations différentes mais aux conséquences identiques. Cela complexifie la thérapie génique car cela implique le développement de vecteurs spécifiques à chaque gène. Dans le futur, le contrôle du niveau d'expression du transgène pourra également s'avérer déterminant dans l'optimisation des résultats de la thérapie génique afin d'éviter des effets délétères tout en maximisant les bénéfices (Roy et al., 2010).

Sources :

1. Kostic C, Chiodini F, Salmon P, et al. Activity analysis of housekeeping promoters using self-inactivating lentiviral vector delivery into the mouse retina. *Gene Ther.* 2003;10(9):818-821.

2. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374(9701):1597-1605.
3. Jamroz-Witkowska A, Kowalska K, Jankowska-Lech I, et al. [Complications of intravitreal injections--own experience]. *Klin Oczna*. 2011;113(4-6):127-131.
4. Gao G, Leberz C, Weiner DJ, et al. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood*. 2004;103(9):3300-3302.
5. Pertusa M, García-Matas S, Mammeri H, et al. Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. *Neurobiol. Aging*. 2008;29(9):1366-1379.
6. Liu MM, Tuo J, Chan C-C. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol*. 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20733027>.
7. Uthra S, Kumaramanickavel G. Gene therapy in ophthalmology. *Oman J Ophthalmol*. 2009;2(3):108-110.
8. Sugano E, Isago H, Wang Z, et al. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Ther*. 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981113>.
9. Harvey AR, Kamphuis W, Eggers R, et al. Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors. *Mol. Cell. Neurosci*. 2002;21(1):141-157.
10. Lam BL, Feuer WJ, Abukhalil F, et al. Leber hereditary optic neuropathy gene therapy clinical trial recruitment: year 1. *Arch. Ophthalmol*. 2010;128(9):1129-1135.
11. Grüter O, Kostic C, Crippa SV, et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse photoreceptors is impaired by the presence of a physical barrier. *Gene Ther*. 2005;12(11):942-947.
12. den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FPM. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J. Clin. Invest*. 2010;120(9):3042-3053.
13. Ritter MR, Banin E, Moreno SK, et al. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J. Clin. Invest*. 2006;116(12):3266-3276.

14. Yokoi K, Kachi S, Zhang HS, et al. Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48(7):3324-3328.
15. Themis M, Waddington SN, Schmidt M, et al. Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol. Ther.* 2005;12(4):763-771.
16. Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR. Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet.* 2009;25(4):156-165.
17. Chung DC, Lee V, Maguire AM. Recent advances in ocular gene therapy. *Current Opinion in Ophthalmology.* 2009;20(5):377-381.
18. Ali RR, Sarra GM, Stephens C, et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat. Genet.* 2000;25(3):306-310.
19. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(19):10319-10323.
20. Balaggan KS, Binley K, Esapa M, et al. Stable and efficient intraocular gene transfer using pseudotyped EIAV lentiviral vectors. *The Journal of Gene Medicine.* 2006;8:275-285.
21. Pearson RA, Barber AC, West EL, et al. Targeted disruption of outer limiting membrane junctional proteins (Crb1 and ZO-1) increases integration of transplanted photoreceptor precursors into the adult wild-type and degenerating retina. *Cell Transplant.* 2010;19(4):487-503.
22. Auricchio, A., Kobinger, G., Anand, V., Hildinger, M., O'Connor, E., Maguire, A. M., Wilson, J. M., and Bennett, J. (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: The retina as a model. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 3075–3081.
23. Rolling, F., Shen, W. Y., Tabarias, H., Constable, I., Kanagasingam, Y., Barry, C. J., and Rakoczy, P. E. (1999). Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography. *Hum. Gene Ther.* **10**: 641–648.
24. Leberherz C., Auricchio A, Maguire A. M., Rivera V. M., Tang V, Grant R. L., Clackson T., Bennett J., and Wilson J. M. Long-Term Inducible Gene Expression in the Eye via Adeno-Associated Virus Gene Transfer in Nonhuman Primates. *Human Gene Therapy.* February 2005, 16(2): 178-186.
25. Takács K, Du Roure C, Nabarro S, et al. The regulated long-term delivery of therapeutic proteins by using antigen-specific B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(46):16298-16303.

26. Calame M, Cachafeiro M, Philippe S, et al. Retinal degeneration progression changes lentiviral vector cell targeting in the retina. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23782.
27. Baum C, Düllmann J, Li Z, et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;101(6):2099-2114.
28. Honda M, Sakamoto T, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H. Experimental subretinal neovascularization is inhibited by adenovirus-mediated soluble VEGF/flt-1 receptor gene transfection: a role of VEGF and possible treatment for SRN in age-related macular degeneration. *Gene Ther*. 2000;7(11):978-985.
29. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(6):721-748.
30. Murata T, Cui J, Taba KE, et al. The possibility of gene therapy for the treatment of choroidal neovascularization. *Ophthalmology*. 2000;107(7):1364-1373.
31. Dorrell MI, Aguilar E, Jacobson R, et al. Antioxidant or neurotrophic factor treatment preserves function in a mouse model of neovascularization-associated oxidative stress. *J. Clin. Invest*. 2009;119(3):611-623.
32. van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA*. 2005;293(12):1509-1513.
33. Bemelmans A-P, Bonnel S, Houhou L, et al. Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *J Gene Med*. 2005;7(10):1367-1374.
34. Tyler, K.L. and Fields, B.N. (1996) Pathogenesis of viral infections. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds), *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Vol. 1, pp. 161–206.
35. Surace EM, Auricchio A. Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *Vision Res*. 2008;48(3):353-359.
36. Clackson, 2000 T. Clackson, Regulated gene expression systems. *Gene Therapy*, 7 2 (2000), pp. 120–125.
37. Pollock et al., 2000 R. Pollock, R. Issner, K. Zoller, S. Natesan, V.M. Rivera and T. Clackson, Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 24 (2000), pp. 13221–13226.
38. Rivera et al., 1996 V.M. Rivera, T. Clackson, S. Natesan, R. Pollock, J.F. Amara and T. Keenan, et al. A humanized system for pharmacologic control of

gene expression. *Nature Medicine*, **2** 9 (1996), pp. 1028–1032.

39. Auricchio, Rivera, et al., 2002 A. Auricchio, V. Rivera, T. Clackson, E. O'Connor, A. Maguire and M. Tolentino, **et al.** Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Molecular Therapy*, **6** 2 (2002), p. 238.

40. Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, et al. (2006) Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 12: 348–353.

41. Campbell M, Humphries M, Kenna P, Humphries P, Brankin B (2007) Altered expression and interaction of adherens junction proteins in the developing OLM of the Rho(-/-) mouse. *Exp Eye Res* 85: 714–720.