

FICHE SUJET DE THESE

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	FINANCEMENT : <input type="checkbox"/> Demandé <input checked="" type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement : CHU Nantes (salaire internat pharmacie, parcours IPR)
Titre de la thèse : HC-NU- Développement d'une plateforme de test préclinique des vecteurs AAV recombinants pour la thérapie génique musculaire à l'aide de cellules souches pluripotentes humaines		3 mots-clés : Thérapie génique Cellules iPS Vecteurs AAV
Unité/équipe encadrante : INSERM UMR 1089 – Translational Research in Gene Therapies - TaRGeT		
Directeur de thèse : Dr. Caroline Le Guiner Co-encadrant : Dr. Jean-Baptiste Dupont		N° de tél : 02 28 08 04 23 Mail : caroline.le-guiner@univ-nantes.fr jean-baptiste.dupont@univ-nantes.fr
<u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :</u> La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique liée au chromosome X et causée par une mutation dans le gène <i>DMD</i> , codant pour la dystrophine. Son déficit provoque une dégénérescence musculaire chez les jeunes garçons, pour laquelle aucun traitement curatif n'existe à ce jour, malgré plusieurs pistes thérapeutiques prometteuses. Parmi elles, la thérapie génique utilisant des vecteurs dérivés du virus adéno-associé (AAV) permet l'expression à long terme de transgènes thérapeutiques tels que la microdystrophine dans les muscles transduits. Quatre essais cliniques « microdystrophine » sont en cours, chacun utilisant un produit thérapeutique dérivé d'un vecteur AAV. Malgré des résultats intermédiaires prometteurs, ces essais ont également donné lieu à des effets secondaires néfastes qui n'avaient jamais été anticipés dans les études précliniques, menant parfois à l'hospitalisation des patients. Il apparaît donc que de nouveaux modèles expérimentaux soient nécessaires, avec un meilleur pouvoir prédictif de l'efficacité et de la toxicité des vecteurs AAV. Dans ce contexte, les cellules souches pluripotentes induites (iPS) dérivées de prélèvements de patients pourraient fournir une alternative crédible, permettant également de cribler rapidement un grand nombre de produits thérapeutiques AAV alternatifs. Des protocoles existent pour différencier les cellules iPS en cellules musculaires squelettiques 2D ou 3D, et en l'absence de dystrophine, elles pourraient permettre d'identifier des phénotypes pathologiques pertinents, sur lesquels se baser pour mettre au point ces nouvelles thérapies.		
<u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :</u> Notre équipe ATIP Avenir vise à développer des modèles expérimentaux <i>in vitro</i> basés sur des cellules iPS différenciées en cellules musculaires striées squelettiques en 2D et en organoïdes musculaires 3D pour reproduire les phénotypes de myopathies héréditaires telles que la DMD. Notre hypothèse de travail suppose que ces modèles pourront à terme être utilisés comme alternative – voire substitut – à l'expérimentation animale, au moins pour certaines phases de développement pré-clinique des médicaments de thérapie génique. Ce projet nous permettra de répondre aux questions suivantes : 1) Quelle est l'efficacité de transduction des vecteurs AAV de différents sérotypes dans des cellules iPS différenciées en muscle 2D et 3D ? 2) Quels phénotypes de la DMD peuvent être reproduits par ces modèles iPS 2D/3D, et peuvent-ils être corrigés par thérapie génique AAV ? 3) Quel est le pouvoir de prédiction des organoïdes musculaires pour le criblage de capsides d'AAV chimiquement modifiées ?		
<u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :</u> 1) Détermination des paramètres optimaux pour la transduction de cellules musculaires dérivées d'iPS par des vecteurs AAV : Dans un premier temps, des progéniteurs myogéniques dérivés de cellules iPS seront différenciés en myotubes 2D et transduits par des vecteurs AAV de différents sérotypes exprimant un transgène rapporteur (ex. GFP). L'efficacité d'expression du transgène sera mesurée pour des doses de vecteurs croissantes, ainsi que différents promoteurs (ubiquitaires ou spécifiques du muscle). Ces expériences seront ensuite reproduites dans un modèle d'organoïde musculaire 3D dérivé de cellules iPS, actuellement en développement au laboratoire. 2) Caractérisation des phénotypes des myotubes dérivés de cellules iPS de patients DMD et d'une thérapie génique corrective : Des cellules iPS portant des mutations responsables de la DMD seront ensuite utilisées pour produire des myotubes 2D et des organoïdes musculaires 3D. Les phénotypes de ces nouveaux modèles seront évalués au niveau structural, fonctionnel, et par une comparaison exhaustive de leur programme d'expression génique. En parallèle, l'effet d'un vecteur AAV exprimant un transgène thérapeutique microdystrophine sera évalué selon les paramètres déterminés ci-dessus. 3) Criblage de capsides AAV chimiquement modifiées avec un tropisme musculaire amélioré sur le modèle iPS : La plateforme organoïde sera finalement utilisée pour cribler des capsides artificielles développées au laboratoire par bioconjugaison de peptides possédant une affinité pour les cellules musculaires. À terme, les plus efficaces d'entre elles seront comparées au sérotype d'origine dans le modèle de rat <i>DMDmdx</i> utilisé au laboratoire (biodistribution, expression du transgène, efficacité thérapeutique), pour évaluer le pouvoir prédictif de ces modèles innovants.		
<u>Compétences scientifiques et techniques requises par le candidat (2 lignes) :</u> Compétences scientifiques : biologie des cellules souches, biologie des vecteurs AAVr, physiopathologie musculaire, thérapie génique Compétences techniques : culture de cellules souches, transduction AAVr, immunomarquages et imagerie confocale 2D / 3D, électrophysiologie		
<u>3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :</u> 1) Mournetas V, Massouridès E, Dupont JB, Kornobis E, Polvêche H, Jarrige M, Dorval ARL, Gosselin MRF, Manousopoulou A, Garbis SD, Górecki DC, Pinset C. Myogenesis modelled by human pluripotent stem cells: a multi-omic study of Duchenne myopathy early onset. <i>J Cachexia Sarcopenia Muscle</i> . 2021 Feb;12(1):209-232. doi: 10.1002/jcsm.12665. Epub 2021 Feb 14. PMID: 33586340; PMCID: PMC7890274. 2) Dupont J-B, Guo J, Renaud-Gabardos E, Poulard K, Latournerie V, Lawlor MW, et al. AAV-Mediated Gene Transfer Restores a Normal Muscle Transcriptome in a Canine Model of X-Linked Myotubular Myopathy. <i>Mol Ther</i> . 5 févr 2020;28(2):382-93. 3) Le Guiner C, Servais L, Montus M, Larcher T, Fraysse B, Moullec S, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. <i>Nat Commun</i> . 25 juill 2017;8:16105.		
<u>Collaborations nationales et internationales :</u> CEISAM, CNRS UMR 6230 (Nantes, France) Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine (Seattle, USA)		