

Académie Vétérinaire, 21 avril 2011

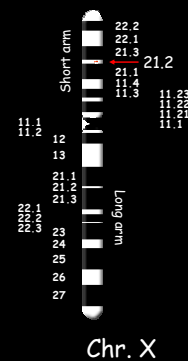
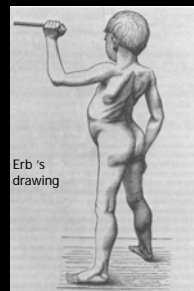
Apport du chien GRMD aux études précliniques thérapeutiques de la myopathie de Duchenne



S. Blot, et coll.
UPR de Neurobiologie
Université Paris Est, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

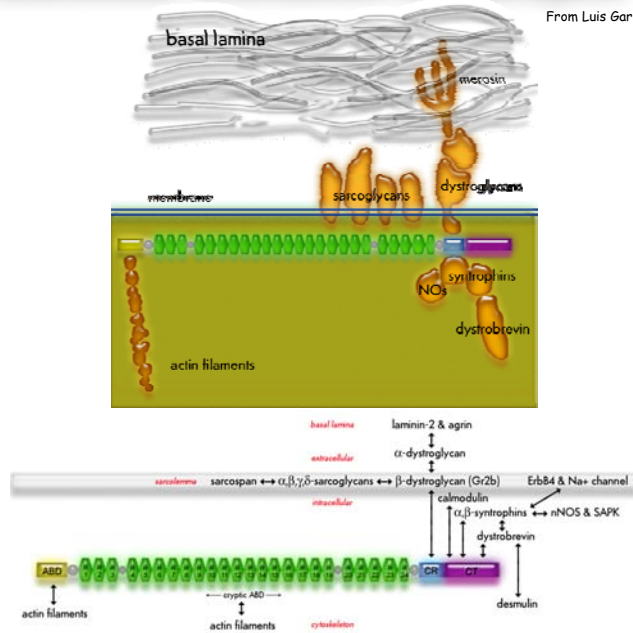
Myopathie dystrophique de Duchenne (DMD)

- Dystrophie musculaire liée au sexe
- Incidence 1/3500 garçons
- **Maladie invalidante et mortelle**
 - Signes cliniques évidents dès l'âge de 3 ans
 - Perte de la locomotion vers 10 ans
 - Atteinte cardiaque, respiratoire, digestive
 - Survie 25 % (Becker)
- **Aucun traitement curatif**






Subcellular localization of dystrophin

From Luis Garcia Institut de Myologie

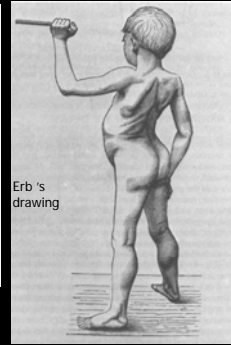


Modèles animaux de DMD

Critères	Homme (5-30 kg) 	Chien (1-10 kg) 	Souris (15-30 g) 
Nom	DMD/BMD	CXMD (GRMD, LRMD, GSHP...)	MDX, MDX ^{2-5CV}
Gene	Dystrophine 70% délétions, duplications, arrangement gène 30% mutations ponctuelles	Dystrophine GRMD = ponctuelle intron 6 LRMD = insertion intron 20 GSHPMD = large délétion CKC = exon 50 ...	Dystrophine MDX = ponctuelle exon 23 ...
Clinique	DMD = forme grave, progressive Diversité clinique - Cardiomyopathie - Respiratoire - Digestive EMG (Fibs, PSW, DCR) CK très élevées	Forme grave (hétérogénéité) GRMD médiane survie = 16 mois - Cardiomyopathie - Respiratoire - Digestive EMG (Fibs, PSW, DCR ++) CK très élevées	Forme bénigne non progres. Cardiomyopathie ? (utr-) EMG ? CK très élevées
Histologie	Nécrose/régénération groupée Calibre hétérogène Fibrose Centralisation nucléaire (calcification) Métaplasie adipocytaire Infiltrats inflammatoires Prédominance type 1 Sur-expression utrophine	Nécrose/régénération groupée Calibre hétérogène Fibrose Centralisation nucléaire Calcification Métaplasie adipocytaire Infiltrats inflammatoires Hypertrophie (sartorius) Prédominance type 1 Sur-expression utrophine	Nécrose/régénération Centralisation nucléaire Hypertrophie des fibres (Fibrose diaphragme) Infiltrats inflammatoires Prédominance ? Utrophine ?

Biotherapies and Canine Myopathies

Physiopathology



Biotherapies

'Cure dogs to cure people'

Biothérapies et DMD, objectifs

Problématique

- Cibler muscles squelettiques, le coeur et les muscles respiratoires
- Distribution appropriée (cellule, muscle, membre, corps entier)
- Objectif de correction : prévenir / renverser / réduire / stopper
- Expression protéique soutenue et prolongée (20-25% fibres)
- Eviter la réponse immune (protéine/vecteur selon la voie utilisée)

Faisabilité
Biosécurité/Toxicité
Efficacité clinique



CXMD (GRMD), best animal counterpart

- Severe clinical phenotype

- Onset*: 1 to 3 months : stiffness, muscle atrophy, macroglossia, ptyalism,
- From 3 to 12 months : degradation, contractures, localized hypertrophy...
- From 12 months : apparent clinical stabilisation

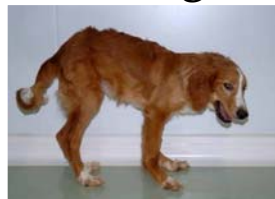
Complications

Swallowing defect, hiatal hernia, bronchopneumonia, Dilated cardiomyopathy

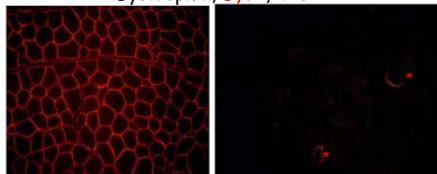
...



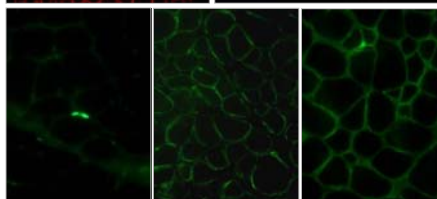
Dystrophin deficient dog (CXMD or GRMD)



Dystrophin, *Dys2*, x20



* Revertant fibers < 0,2%

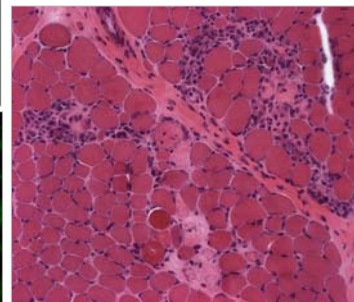


Canine Control (X40)

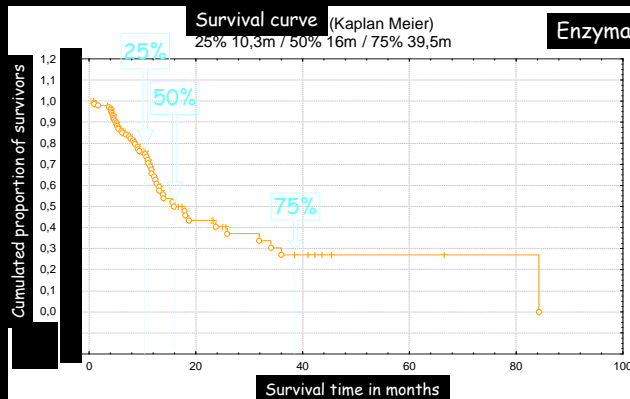
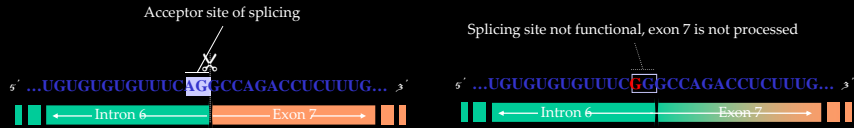
LRMD2 (X40)

GRMD (X40)

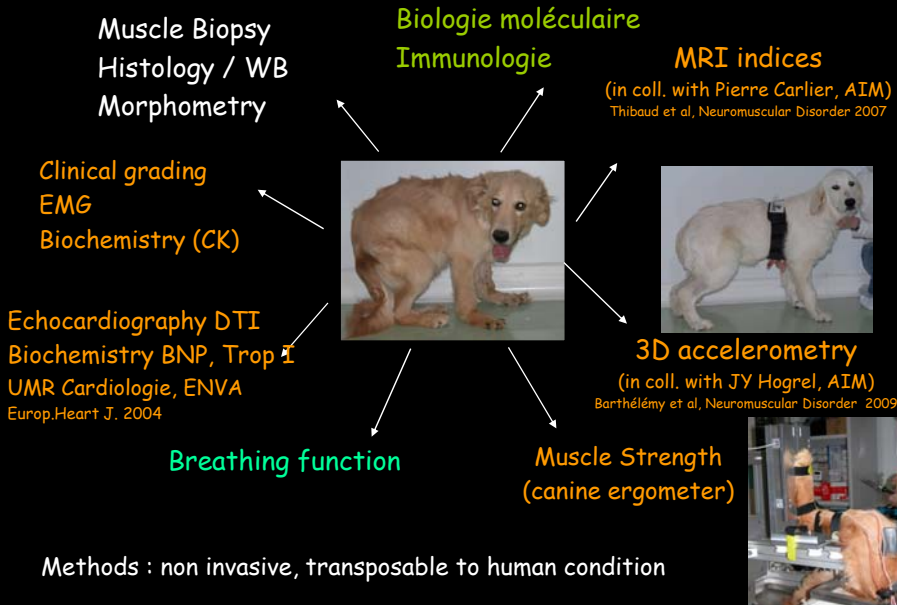
Detection of utrophin (N-ter/DRP2®)



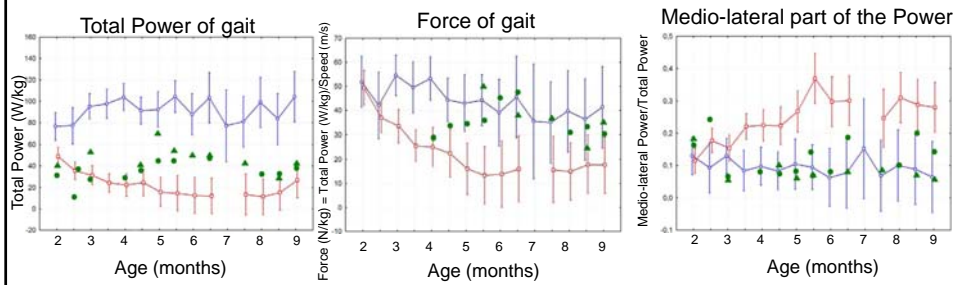
Using GRMD for preclinical studies



Multimodal evaluation (dystrophin deficient dog)



Accelerometry in growing GRMD



I. Barthelemy, et al. Longitudinal Ambulatory Measurements of Gait Abnormality in Dystrophin-Deficient Dogs. *BMC. Musculoskelet. Disorders.* 2011



Biomarqueurs de fonction



Thérapies pharmacologique, cellulaire, génique : l'ère des administrations systémiques

✓ Lésions musculaires

Imagerie RMN (Thibaud et al. 2007)

✓ Faiblesse musculaire

Enregistrement de force

✓ Troubles de la locomotion (dès 2 mois)

Accélérométrie

✓ Insuffisance respiratoire (dès quelques mois)

*Cinématique diaphragmatique
Spirométrie*

✓ Dysphagie (dès quelques mois)

✓ Insuffisance cardiaque CMD (plus tardive)

*Echocardiographie - DTI
(Chetboul et al. 2004)*

Synergie thérapeutique

Thérapie pharmacologique
Utrophine, [bradykinine](#), Predni+CsA

Thérapie cellulaire
Cellules souches
(myoblastes, moelle osseuse, [mésoangioblastes](#), [cardiomyocytes](#)...)



Ecole Vétérinaire d'Alfort

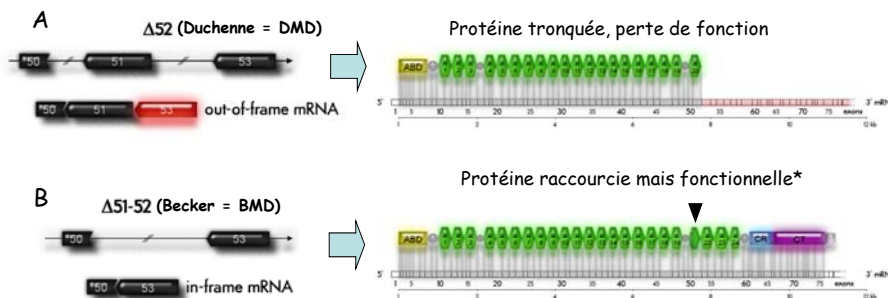
Thérapie génique
Plasmide IV (pathway^{IV})
Electrotransfert
[Saut d'exon](#)
[Immunothérapie](#)



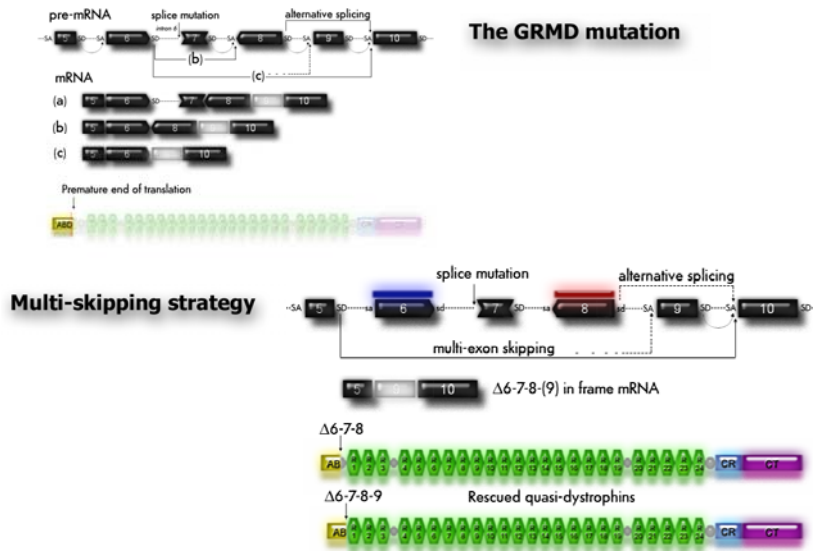
Le saut exon thérapeutique : objectif

(Equipe Luis Garcia, UMRs-974 Pr Thomas Voit)

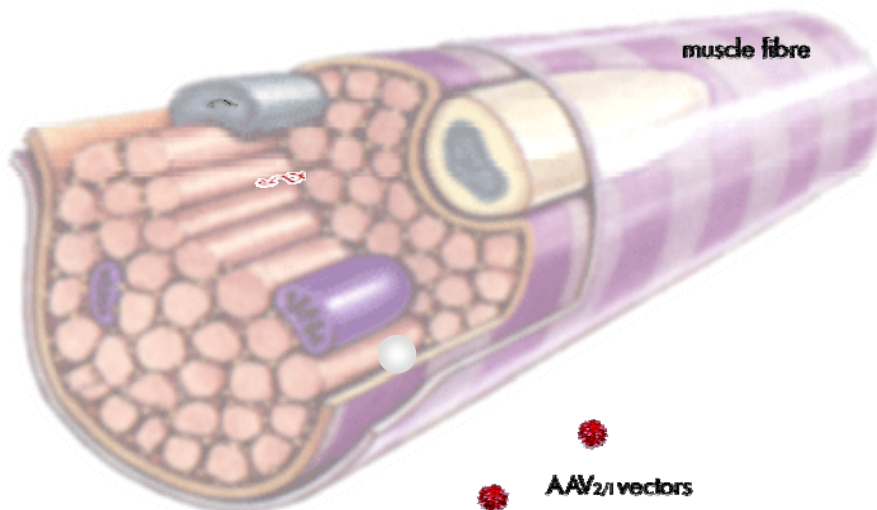
Convertir un patient DMD (ARNm déphasé) en patient BMD (ARNm plus court mais en phase) en manipulant l'épissage

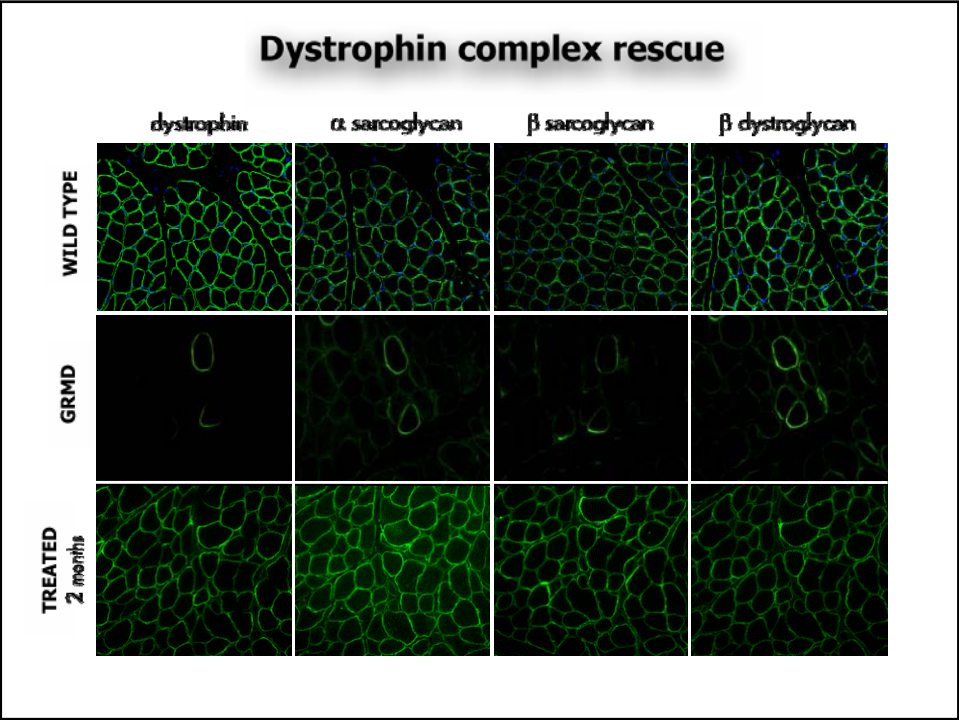
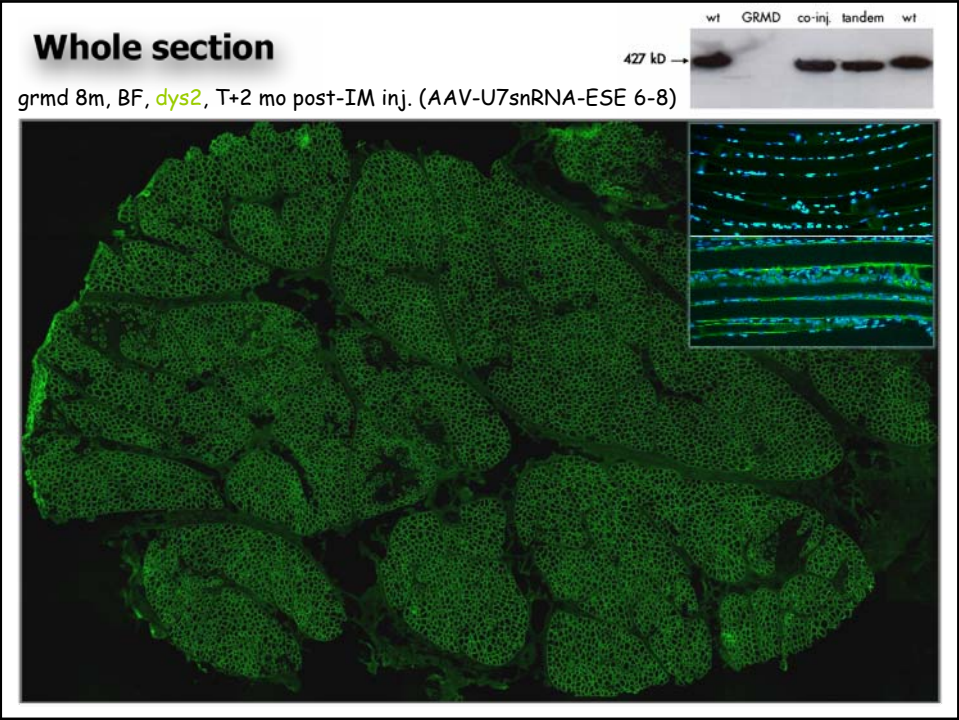


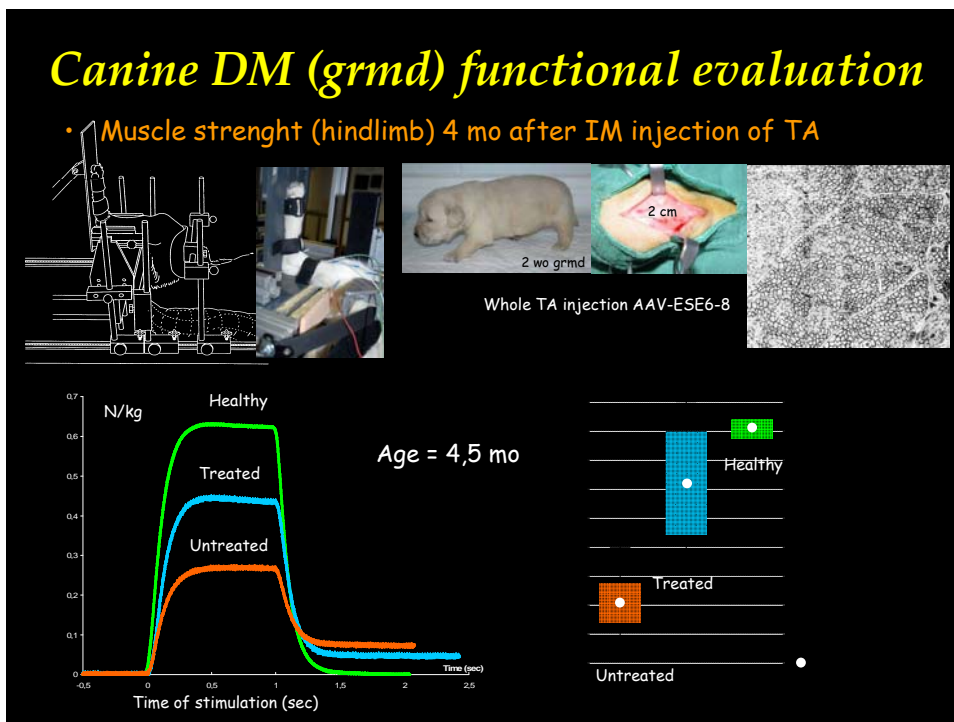
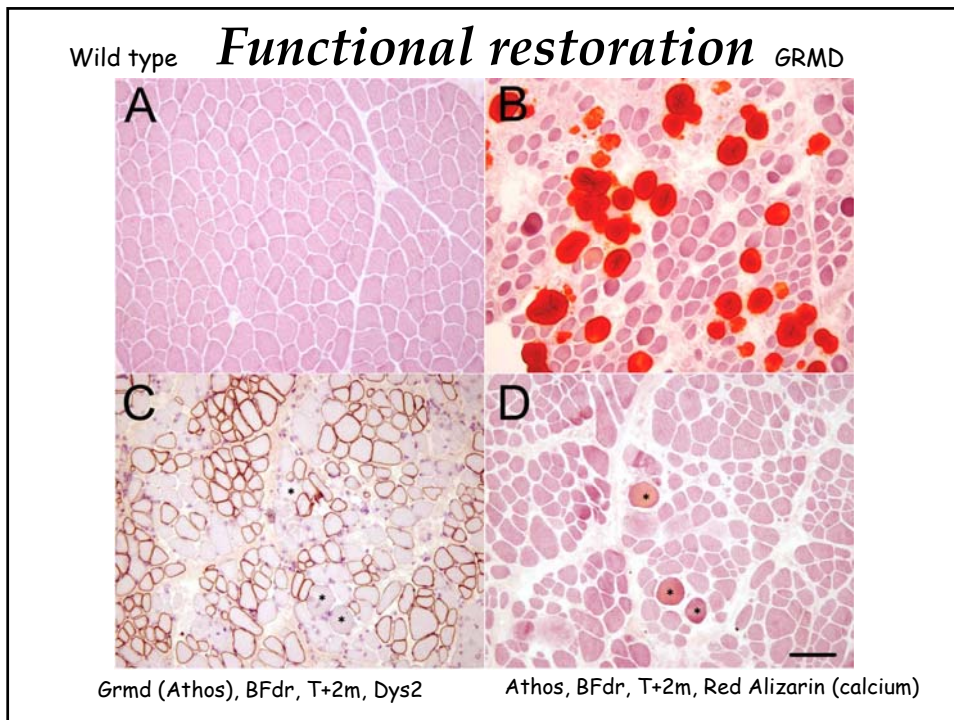
SET et GRMD



The shuttle, an Adeno-Associated Virus







Multi-SE
(injection intraveineuse hydrodynamique)

Post injection intraveineuse d'AAV(U7 C6ESE2) & AAV(U7 C8ESE1) : **2 mois**

The figure shows a multi-panel view of a multi-site electroporation (Multi-SE) experiment. On the left, two photographs show a dog undergoing intravenous injection and a surgical procedure on its muscle. The top right shows a schematic of a muscle fiber with an injection site. The main image is a large fluorescence microscopy image of a muscle section, showing green fluorescent nuclei and red fluorescent structures. An inset provides a higher magnification of the muscle fibers, highlighting the green nuclei and red structures within the fiber compartments.

Systemic delivery – intra-arterial

Chiot grmd (Djazz), injection intraventriculaire gauche à l'âge de 5 semaines

UE TM V2PZ10 139711 Ex 08-1293
2008 Jan 08 M 08-1293
Acc Se 1/11 Im 4/115 (Fr. 1/115)
Imp Tm 19 21 45

UE TM V2PZ10 139711 Ex 08-1293
2008 Jan 08 M 08-1293
Acc Se 1/11 Im 4/115 (Fr. 1/115)
Imp Tm 19 23 18

IE DCM / Lin DCM / 1920 W 159 L 79

IE DCM / Lin DCM / 1920 W 161 L 60

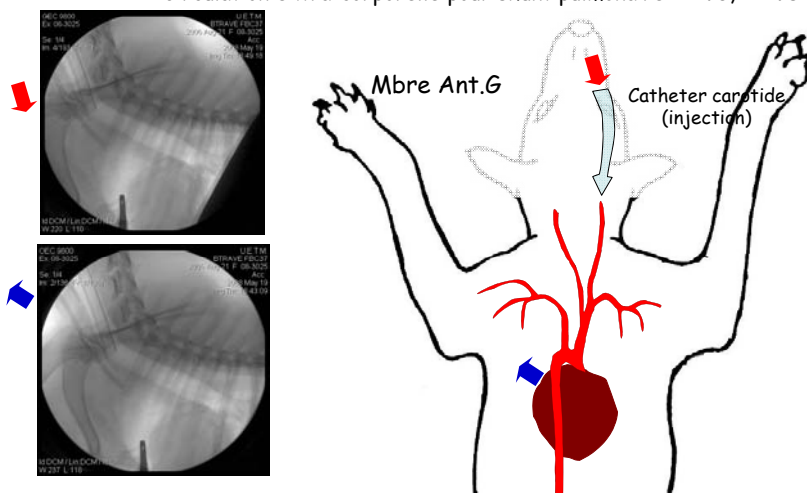
TB, dys2, T+2mo

Angiogramme ventriculaire gauche (AAV6, 100 ml à 10^{12} vg/ml, soit 3.7×10^{10} vg/g)

The figure illustrates systemic delivery via intra-arterial injection. It includes a photograph of a golden retriever puppy, two chest X-rays (angiograms) showing the left ventricle, and two histology images of muscle tissue. The X-rays are labeled with technical details and dates. The histology images show muscle fibers with some pathological changes, labeled as TB, dys2, T+2mo.

SET et GRMD

- Le SET : Approche corps entier
 - 2. Développement et optimisation
 - Distribution systémique (vg 10^{12} à 10^{14}) Yves Fromes UMRs974
 - Circulation extra-corporelle pour shunt pulmonaire AAV6, AAV8



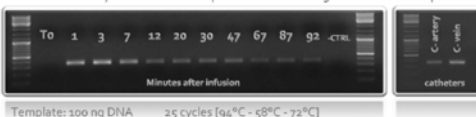
SET et GRMD

- Le SET : Approche corps entier
 - 2. Développement et optimisation
 - Distribution systémique par circulation extra-corporelle
 - Machine de CEC, shunt pulmonaire et AAV6, AAV8

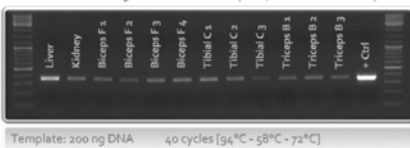
Cardio-pulmonary by-pass
 200 ml AAV2/6 @ 1.35×10^{12} vg/ml
 4 x 50 ml @ 10 ml/sec - 1 hr intermission
 Vector dose: 2.7×10^{14} vg / 2.8×10^{13} vg/kg

⇒ Médiocre transfection musculaire

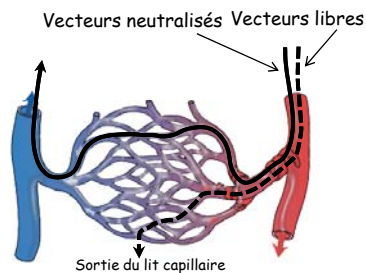
AAV detection by PCR in blood samples taken out during the course of the perfusion



Detection of vector genome in tissue biopsies, two months after perfusion



Interactions moléculaires (AC ...) ?



Rôle de la *Gal-3BP* : AAV1/AAV6/AAV8

SET et GRMD

- Le SET : Approche corps entier
 - 2. Développement et optimisation
 - Distribution systémique 48h post-natale : AAV8, AAV9 (5×10^{11} vg/g)

AAV9-GFP

AAV9 chez le nouveau né : Yue et al, Mol. Ther., 2008 (AAV9-hAP)
Kornegay et al. Mol. Ther., 2010 (AAV9-hminiDys)



Conclusions

- **GRMD, un modèle de DMD**
 - Référence pour les essais précliniques selon TREAT-NMD
 - Nécessité de biomarqueurs
 - suivi de la maladie et appréciation bénéfique, approche multimodale
 - Développement de marqueurs prédictifs des formes cliniques
- **GRMD, saut d'exon thérapeutique + AAV**
 - Validation du bénéfice par injection IM et hydrodynamique
 - Expression maintenue dans le temps
 - Multi saut d'exon réalisable,
 - Administration IV - choix du sérotype viral (interaction sanguine)
 - Administration IV - production en quantité de virus (2.10×10^{11} vg/g)
 - Excellente tolérance systémique
 - Pas de réponse immune anti-dystrophine (SET)
 - Mais réponse immune anti-virale : nouvelle génération AAV
 - Futur : combinaison thérapie génique/cellulaire/pharmacologique

Collaborative network on canine myopathies



▪ Transgene SA

Serge Braun (now AFM) plasmid
Thierry Huss
Christine Thioudellet
Nathalie Accart

▪ Madison University

Jon Wolff (pathway^{TV})
Julia Hegge
Hans Herweijer

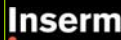


▪ Institut Cochin



Jean-Claude Kaplan
France Leturcq
(LRMD)

▪ EMI 00-11



Romain Ghérardi
Patrick Dreyfus
(CNM)

▪ U640 Inserm-UMR 8151 CNRS

Daniel Scherman
(Electrotransfert/plasmid)

▪ ENVA

Neurobiology laboratory

Inès Barthélémy
Jean-Laurent Thibaud
Matthias Le Chevoir
Aurélien Jeandel
Samia Cohen
Xavier Cauchois
Christelle Bessis
Yves Unterfinger
Nicolas Blanchard
Olivier Borie
Aurore Brindejont
Angélique Gouffier
Emilie Monnet
Jennifer Chaaboub
Dimitri Dagios
Isabelle Valchère
Stéphane Blot

CCV, Maisons-Alfort

(MRI, CT-scan, scintigraphy)
Patrick Devauchelle

UMR INRA-ENVA Molecular Biol.

Laurent Tiret Marie Maurer
Jean-Jacques Panthier (CNM)

INSERM UMR 955 cardio.pharm.

(cardiomyopathie)
Luc Hittinger
Valérie Chetboul
Alain Berdeaux

▪ Institut Myologie

Jean-Yves Hogrel (A3D)
Yves Fromes
Gill Butler-Browne
Pierre Carlier (RMN)
Luis Garcia (exon skipping)
Thomas Voit



▪ Stem Cell Research Institut

Giulia Cossu (mesoangioblastes) Milan
Maurilio Sampaolesi
A. Innocenzi
R. Tonlorenzi
Giuseppe D'Antona
Roberto Bottinelli



ENVA

École nationale vétérinaire d'Alfort

Supported by

