



Titre de thèse : *Apports des cellules iPS différenciées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des neuropathies périphériques et correction de celles-ci par thérapie génique (CRSPR-Cas9)*

Financement : contrat doctoral région

Nom de l'équipe et du directeur :

EA6309 (Neuropathies Périphériques et maintenance myélinique) - Pr Franck STURTZ

Encadrants :

Pr Franck STURTZ (PU-PH), Dr Anne-Sophie LIA (MCU-PH), Dr Pierre-Antoine FAYE (AHU)

Contacts : franck.sturtz@unilim.fr / anne-sophie.lia-baldini@unilim.fr

Mots clés :

Cellules iPS, neuropathies, modèles cellulaires, physiopathologie, thérapie génique

Profil et compétences recherchées :

Maîtrise de la culture cellulaire, des techniques d'immunohistochimie, des techniques de biologie moléculaire classique (PCR, extractions ARN, ADN et protéines, Southern, Northern, Western blots)

Description de la problématique de recherche :

Les neuropathies périphériques héréditaires constituent un problème médical important parce que la prévalence de ces maladies est de 1/2500 personnes et qu'aucune thérapeutique n'est aujourd'hui disponible. Il apparaît donc nécessaire de proposer des modèles cellulaires qui miment très précisément les anomalies observées en clinique humaine, pour pouvoir envisager des corrections géniques adaptées.

Thématique / Domaine / Contexte :

L'EA6309, spécialisée dans l'étude des neuropathies héréditaires de type Charcot-Marie-Tooth, a mis au point un protocole permettant d'obtenir des cellules iPS de patients et de les différencier en motoneurones. Des études ont été menées qui montrent, chez un patient porteur d'une double mutation dans le gène GDAP1, des anomalies mitochondriales. La mise au point des techniques de thérapie par CRSPR-Cas9 permettent d'envisager la correction des anomalies géniques et donc du fonctionnement mitochondrial.

Objectifs :

Le but de cette thèse est de poursuivre l'effort engagé sur les cellules iPS en générant de nouvelles lignées de cellules iPS de patients atteints de CMT et d'étudier leurs caractéristiques cellulaires. Mais, lors de cette thèse, l'étudiant devra aussi mettre au point une stratégie de thérapie génique basée sur le système CRSPR-Cas9 et permettant de corriger les cellules mutées de patients.

Méthodes :

Les méthodes qui seront utilisées seront : obtention de fibroblastes de patients CMT, induction à la pluripotence de ces cellules par le cocktail de Yamanaka (introduction de plasmides), caractérisation de cellules iPS, vérifications de la qualité (Caryotype, CGH,...), induction d'une différenciation en motoneurones, observation des anomalies cellulaires (histologie, microscopie électronique et confocale), pour la partie 1. Pour la partie 2, la stratégie de thérapie génique sera à mettre au point, après formation dans un laboratoire qui maîtrise le sujet.

Résultats attendus :

Les résultats attendus sont une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des neuropathies CMT et, si possible, une correction de ceux-ci par une thérapie génique à mettre au point.

Références bibliographiques :

1. Faye, Pierre-Antoine, Nicolas Vedrenne, Miguel A. De la Cruz-Morcillo, Claire-Cécile Barrot, Laurence Richard, Sylvie Bourthoumieu, Franck Sturtz, Benoît Funalot, Anne-Sophie Lia, and Serge Battu. 2016. 'New Method for Sorting Endothelial and Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Sedimentation Field Flow Fractionation'. *Analytical Chemistry* 88 (13): 6696–6702. doi:10.1021/acs.analchem.6b00704.
2. Danigo, Aurore, Laurent Magy, Laurence Richard, Franck Sturtz, Benoît Funalot, and Claire Demiot. 2014. 'A Reversible Functional Sensory Neuropathy Model'. *Neuroscience Letters* 571 (June): 39–44. doi:10.1016/j.neulet.2014.04.026.
3. Hsu, Patrick D., Eric S. Lander, and Feng Zhang. 2014. 'Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering'. *Cell* 157 (6): 1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
4. Sternberg, Samuel H., and Jennifer A. Doudna. 2015. 'Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9'. *Molecular Cell* 58 (4): 568–74. doi:10.1016/j.molcel.2015.02.032.



Topic title : Contribution of differentiated iPS cells in the understanding of the pathophysiological mechanisms of peripheral neuropathies and correction of these by gene therapy (CRSPR-Cas9)

Financing : region

Name of team and director:

EA6309 (Peripheral Neuropathies and myelin maintenance) - Prof. Franck STURTZ

Supervisors :

Pr Franck STURTZ (PU-PH), Dr Anne-Sophie LIA(MCU-PH), Dr Pierre-Antoine FAYE (AHU)
franck.sturtz@unilim.fr / anne-sophie.lia-baldini@unilim.fr

Keywords :

iPS cells, neuropathies, cell models, pathophysiology, gene therapy

Profile and skills required:

Mastery of cell culture, immunohistochemistry techniques, classical molecular biology techniques (PCR, RNA extractions, DNA and proteins, Southern, Northern, Western blots)

Description of the research problem:

Peripheral hereditary neuropathies are an important medical problem because the prevalence of these diseases is 1/2500 people and no therapy is available today. It therefore appears necessary to propose cellular models that mimic very precisely the anomalies observed in human clinical, in order to be able to envisage adapted genetic corrections.

Theme / Domain / Context:

EA6309, specializing in the study of Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathies, developed a protocol for obtaining iPS cells from patients and differentiating them into motor neurons. Studies have been conducted which show, in a patient carrying a double mutation in the GDAP1 gene, mitochondrial abnormalities. The development of the CRSPR-Cas9 therapy techniques make it possible to envisage the correction of the gene abnormalities and thus of the mitochondrial functioning.

Objectives:

The aim of this thesis is to continue the effort made on iPS cells by generating new iPS cell lines from patients with CMT and to study their cellular characteristics. But in this thesis, the student will also have to develop a strategy of gene therapy based on the CRSPR-Cas9 system and allowing to correct the mutated cells of patients.

Methods :

The methods that will be used will be: obtaining fibroblasts from CMT patients, inducing the pluripotency of these cells by the Yamanaka cocktail (introduction of plasmids), characterization of iPS cells, quality checks (Caryotype, CGH, ...), induction of a differentiation in motor neurons, observation of the cellular anomalies (histology, electron microscopy and confocal), for part 1. For part 2, the gene therapy strategy will have to be developed, after training in a laboratory mastering the technique.

Expected results :

The expected results are a better knowledge of the cellular and molecular mechanisms responsible for CMT neuropathies and, if possible, correction of these by gene therapy to be developed.

References:

- Faye, Pierre-Antoine, Nicolas Vedrenne, Miguel A. De la Cruz-Morcillo, Claire-Cécile Barrot, Laurence Richard, Sylvie Bourthoumieu, Franck Sturtz, Benoît Funalot, Anne-Sophie Lia, and Serge Battu. 2016. 'New Method for Sorting Endothelial and Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Sedimentation Field Flow Fractionation'. *Analytical Chemistry* 88 (13): 6696–6702. doi:10.1021/acs.analchem.6b00704.
- Danigo, Aurore, Laurent Magy, Laurence Richard, Franck Sturtz, Benoît Funalot, and Claire Demiot. 2014. 'A Reversible Functional Sensory Neuropathy Model'. *Neuroscience Letters* 571 (June): 39–44. doi:10.1016/j.neulet.2014.04.026.
- Hsu, Patrick D., Eric S. Lander, and Feng Zhang. 2014. 'Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering'. *Cell* 157 (6): 1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
- Sternberg, Samuel H., and Jennifer A. Doudna. 2015. 'Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9'. *Molecular Cell* 58 (4): 568–74. doi:10.1016/j.molcel.2015.02.032.