

INGÉNIERIE MOLÉCULAIRE DES MICROGLIES

C. Morival¹, T. Cronin¹, N. Jaulin¹, A. Leray², D. Deniaud², M. Mével¹, O. Adjali¹

1 INTRODUCTION

Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC). En réponse à un trauma ou une infection, les cellules microgliales sont capables de s'activer, et ont traditionnellement été classées en deux états : l'état activé classique (M1), considéré comme pro-inflammatoire ; et l'état activé alternatif (M2), considéré comme anti-inflammatoire.

De nombreux phénomènes d'inflammation délétères ont été observés au cours de maladies neurodégénératives, où l'activation classique des microglies favorise la destruction neuronale. Pour ces pathologies incurables, on cherche à retarder l'apparition des premiers symptômes, et à ralentir la destruction des tissus neuronaux : la microglie apparaît alors comme une cible thérapeutique intéressante. On pourrait imaginer effectuer un shift de l'état d'activation de ces cellules, de l'état M1, accélérant la dégénérescence, à l'état M2, qui semble être plus bénéfique. Cependant, cibler précisément ce type cellulaire au sein du SNC n'est pas simple : les microglies, comme d'autres cellules immunitaires, restent relativement réfractaires à la transduction.

En 2016, Rosario et son équipe ont montré qu'il était possible de transduire les cellules microgliales en utilisant une capsid modifiée pour contourner la protéolyse endosomale.

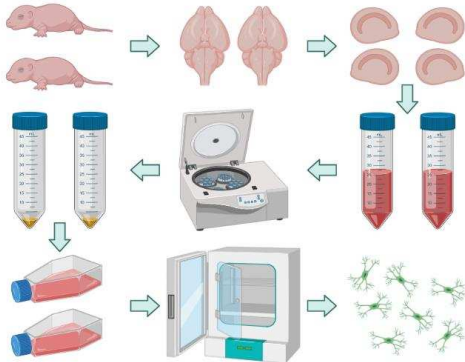
2 OBJECTIFS

- Transduire de manière efficace les microglies
- Déterminer l'impact de la protéolyse endosomale sur l'expression du transgène.
- Observer la réponse immunitaire microgliale (sensing viral, profil cytokinique)

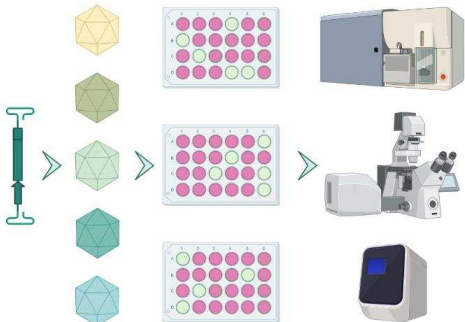
3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

Deux modèles sont utilisés pour évaluer la transduction des microglies : des cellules primaires de souris, ainsi qu'une lignée humaine microgliale immortelle (ATCC® CRL-3304™).

- Isolation des cellules microgliales primaires de souris



- Tests de transduction



Illustrations créées avec BioRender.com

4 RÉSULTATS

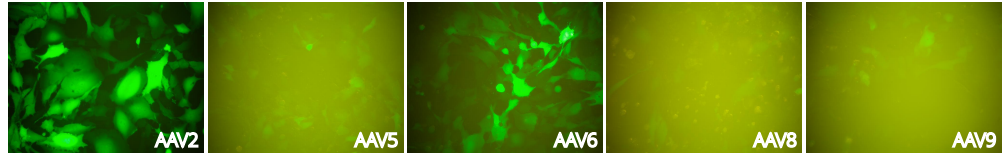


Figure 1. Les cellules HMC3 sont transduites par différentes capsides non modifiées.

Images par fluorescence de cultures de cellules HMC3, transduites avec différentes capsides non modifiées (AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9), exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur CAG (J = 3, MOI = 10⁵).

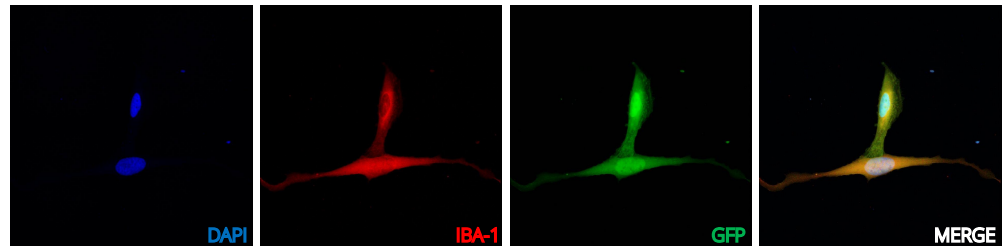


Figure 2. Deux cellules HMC3 transduites par une capsid AAV2, exprimant la GFP.

Marquage par IBA-1 (en rouge), DAPI (en bleu).

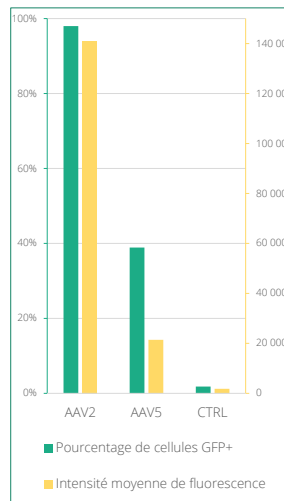


Figure 3. Pourcentage de cellules exprimant la GFP et intensité moyenne de fluorescence, en fonction de la capsid utilisée.

Analyse par FACS.

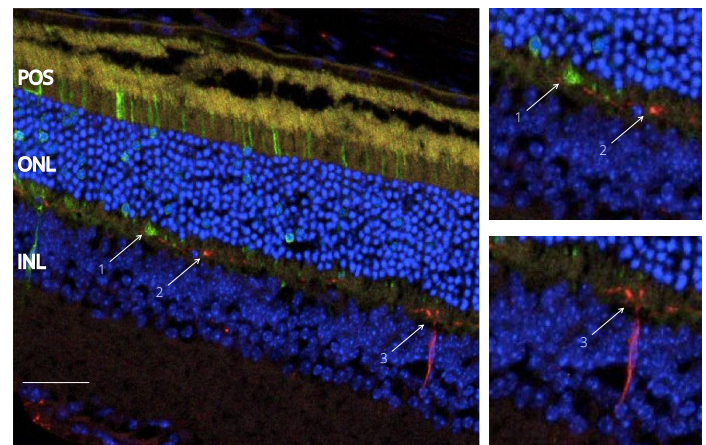


Figure 4. Rétine de souris injectée avec une capsid AAV2 exprimant la GFP.

Marquage par IBA-1 (en rouge), DAPI (en bleu).

- 1 : microglie transduite activée
- 2 : microglie non transduite activée
- 3 : microglie non transduite non activée

POS : segments externes des photorécepteurs ; ONL : couche nucléaire externe ; INL : couche nucléaire interne

5 CONCLUSION

Les données des premiers tests indiquent qu'il est possible de transduire les cellules microgliales de la lignée HMC3 à l'aide de différentes capsides non mutées, exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur CAG. Ces résultats n'ont cependant pas pu être reproduits sur les microglies primaires de souris. Les cellules microgliales primaires isolées à partir d'une culture gliale mixte présentent une auto fluorescence marquée, qui pourrait potentiellement masquer la fluorescence liée à la GFP.

Aucun changement de morphologie, synonyme d'activation, n'a été observé au sein des cellules HMC3 et des cellules primaires au cours de la transduction. L'ARN de cellules microgliales a cependant été extrait afin de quantifier l'expression de gènes liés au sensing viral. Sur les rétines de souris injectées par des AAVs, la présence très sporadique de microglies ne permet pas de leur attribuer une activation plus importante comparée à une rétine non injectée.

D'autres expériences sont en cours, notamment pour afin d'observer l'effet de la protéolyse endosomale sur l'expression du transgène (modification du tropisme, augmentation du % de cellules transduites, intensité de fluorescence moyenne). Elles permettront de juger l'intérêt de l'utilisation de capsides modifiées.

6 RÉFÉRENCES

1. Rosario AM, Cruz PE, Ceballos-Diaz C, Strickland MR, Siemienski Z, Pardo M, Schob KL, Li A, Aslanidi GV, Srivastava A, Golde TE, Chakrabarty P. Microglia-specific targeting by novel capsid-modified AAV6 vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016 Apr 13;3:16026. doi: 10.1038/mtm.2016.26. PMID: 27308302; PMCID: PMC4909093.
2. Dello Russo C, Cappoli N, Coletta I, Mezzogori D, Paciello F, Pozzoli G, Navarra P, Battaglia A. The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review. *J Neuroinflammation.* 2018 Sep 10;15(1):259. doi: 10.1186/s12974-018-1288-0. PMID: 30200996; PMCID: PMC6131758.
3. Saura J, Tussell JM, Serratos J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia.* 2003 Dec;44(3):183-9. doi: 10.1002/glia.10274. PMID: 14603460.

¹ INSERM UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, 44200 Nantes, France.

² Université de Nantes, CNRS, CEISAM UMR 6230, F-44000 Nantes, France