

## ***Chapitre III : Stratégies de la thérapie génique***

### **Introduction**

Corriger un gène défectueux implique d'abord de connaître le gène et le rôle de la protéine qu'il encode. Ensuite, l'isolation de ce gène non muté à partir de cellules saines en le munissant de séquences indispensables à sa régulation permettra d'insérer la construction génique dans un vecteur, généralement un virus désactivé. L'étape ultérieure est d'injecter les vecteurs modifiés *ex vivo* ou *in vivo* chez le malade espérant conférer une modification thérapeutique durable

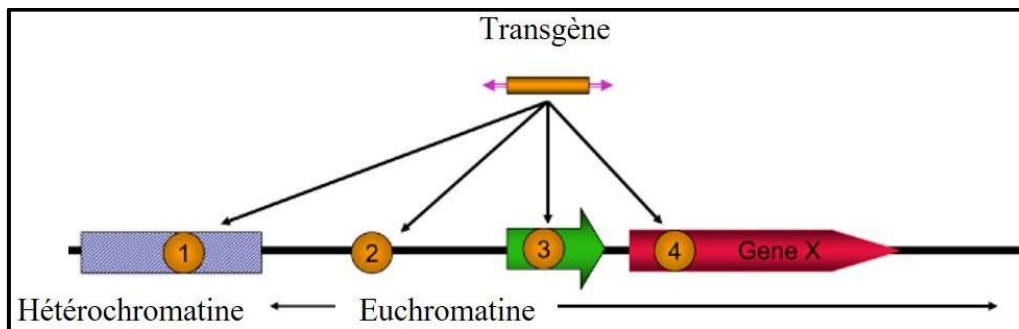
Dans le cas d'une affection qui touche les cellules sanguines, par exemple les patients atteints d'immunodéficience, on prélèvera des cellules souches hématopoïétiques qui seront mises en contact *ex vivo* avec un vecteur modifié contenant la construction génique adéquate et qui seront ensuite mises en culture. Les cellules exprimant le gène thérapeutique seront finalement réinjectées dans la circulation sanguine du patient par voie intraveineuse en espérant qu'elles contribueront à le soigner. L'avantage de cette approche est de modifier une population de cellules bien précise, sans risque de voir le vecteur pénétrer dans des organes non ciblés. Cependant, il n'est pas toujours possible de prélever les cellules à corriger comme des cellules cardiaques ou des neurones. Ainsi l'injection du vecteur contenant le gène thérapeutique se réalise directement dans les organes cibles *in vivo*. Ce processus est employé pour traiter, par infusion directe des vecteurs dans les cellules hépatiques, les bronches des poumons, les muscles, plusieurs affections comme l'hémophilie, la mucoviscidose, la dystrophie musculaire et détruire les tumeurs.

### **1- Modalités d'utilisation de la thérapie génique**

#### **4-1 Addition d'un gène**

L'addition d'un gène consiste à insérer dans le noyau cellulaire ou directement dans le génome de la cellule hôte un nouveau gène, qu'on appelle **transgène**. Dans la plupart des cas, l'expression du transgène permet à la cellule de produire son propre médicament. Cette méthode ne fonctionne que si la maladie est due à une protéine non ou peu fonctionnelle. Le transgène peut rester en dehors du génome : il se comporte alors comme un épisode, se réplique de façon indépendante, mais peut être perdu lors des divisions cellulaires. Ou bien, il peut être inséré dans le génome par le vecteur. Il est alors important de pouvoir contrôler le

site d'insertion (par exemple dans une région de l'ADN qui peut être modifiée sans crainte de provoquer des mutations) afin de ne pas modifier des gènes fonctionnels (Figure 1)



**Figure 1** : Conséquences de l'intégration d'un transgène au sein d'un génome hôte

1. L'intégration au sein de l'hétérochromatine ne permet généralement pas l'expression du transgène et n'a aucune conséquence sur le génome de l'hôte.
2. L'intégration au sein de l'euchromatine, entre les gènes est la situation idéale. Le transgène peut s'exprimer sans modification de l'expression du génome de l'hôte.
3. L'intégration au sein d'une région régulatrice de la transcription peut avoir plusieurs conséquences. Le transgène s'exprime dans la majorité des cas mais son expression peut être modifiée par les éléments régulateurs environnants. En parallèle, les éléments régulateurs présents dans la cassette génique peuvent modifier l'expression des gènes environnants voire empêcher l'expression d'un gène actif.
4. L'intégration au sein d'une région transcrite d'un gène (ici, gène X) permet l'expression du transgène mais peut bloquer l'expression du gène X ou provoquer la production d'une protéine mutée à partir de ce gène.

Les situations 3 et 4 sont les plus dangereuses car elles peuvent conduire à de graves mutations et à l'apparition de cellules tumorales. Il est donc crucial de pouvoir contrôler les sites d'insertion des transgènes par l'étude et la sélection des vecteurs.

#### 4-2 Réparation des gènes

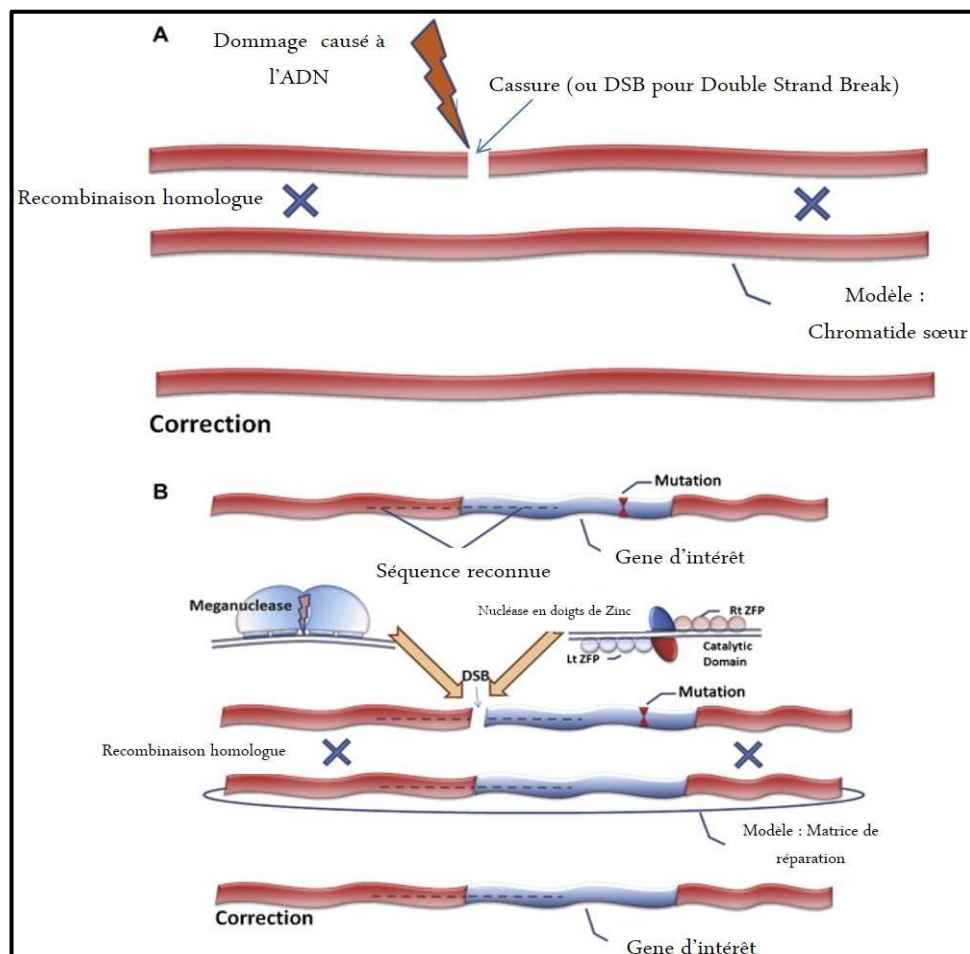
La réparation des gènes consiste à utiliser une séquence d'ADN ou d'ARN pour modifier le génome de la cellule hôte et corriger l'anomalie d'expression du gène à l'origine de la maladie. Plusieurs techniques utilisant l'allèle entier sont à l'étude :

- Remplacement de l'allèle muté par recombinaison homologue spontanée avec l'allèle normal. Dans ce cas, on injecte dans les cellules cibles des allèles sauvages sans autre molécule pour aider à la recombinaison homologue. Cependant, la fréquence de

recombinaison homologue spontanée est très faible (inférieure à 1/106 cellules modifiées). (Figure 2, A)

- Remplacement des deux allèles par insertion d'une séquence d'ADN double brin sur le même locus pour permettre une régulation normale du transgène. On utilise alors des endonucléases endogènes, des nucléases en doigts de zinc (Figure 2, B) ou des enzymes synthétiques, spécifiques d'une région de l'ADN afin de cibler le locus, exciser les allèles endogènes et les remplacer par les allèles sauvages. La régulation du gène est donc conservée.

Il existe aussi des méthodes de remplacement d'un seul nucléotide par recombinaison homologue avec des oligonucléotides. Les oligonucléotides synthétiques ne diffèrent de la séquence génétique ciblée que par quelques bases azotées (une à cinq) afin de garantir la possibilité d'une recombinaison homologue. La modification du génome cible est alors réalisée par le système endogène de réparation de l'ADN



**Figure 2:** Recombinaison homologue. **A** : spontanée, **B** : Intervention d'une nucléase en doigts de Zinc

- **Nucléase à doigts de zinc**

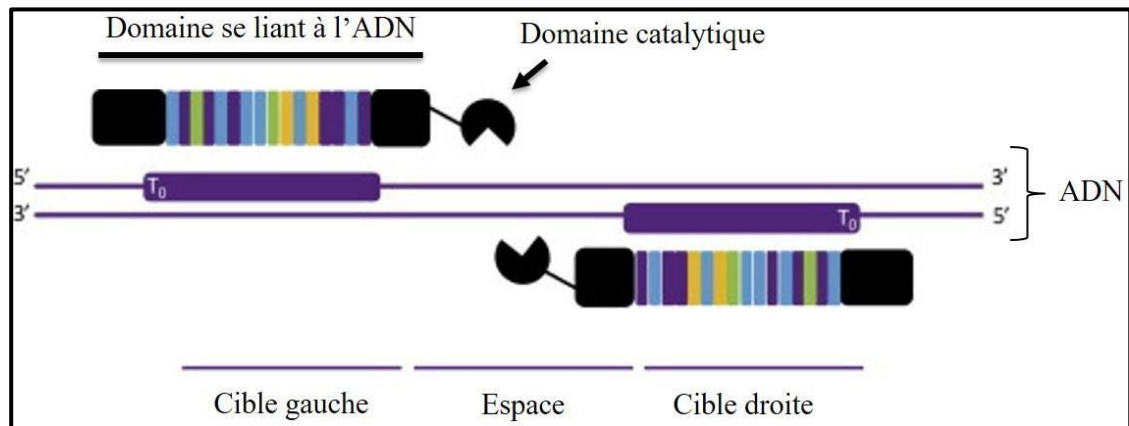
Une enzyme de restriction synthétique dont le domaine catalytique et le domaine de liaison à l'ADN sont respectivement constitués d'une enzyme de type Fok I et de doigts de zinc. Les nucléases à doigt de zinc ont la capacité de repérer une séquence de nucléotides spécifique dans une cellule et de provoquer une coupure de l'ADN à un endroit précis.

D'autres systèmes de clivage spécifique de l'ADN/ARN sont à l'étude et pourront être utilisés à terme en thérapie génique comme les enzymes en doigts de zinc. Ces systèmes sont actuellement utilisés en ingénierie des génomes. On peut citer par exemple les Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) et les Clustered Short Palindromic Repeats (CRISPR).

- **Les TALEN**

Sont des protéines chimériques contenant un domaine capable de se lier à l'ADN de manière spécifique (appelé TALE) et un domaine catalytique non spécifique (une nucléase). Le domaine se liant à l'ADN est dérivé de protéines appelées TALE pour Transcription Activator-Like Effectors présentes chez les bactéries du genre *Xanthomonas*. Ces bactéries sont des parasites végétaux ; les TALE leur permettent d'induire l'expression de certains gènes chez leur hôte. Le domaine se liant à l'ADN des TALE est composé de 13 à 28 unités de répétition de 34 acides aminés chacune. Ces unités de répétition ne se différencient que par deux résidus cruciaux en position 12 et 13 (appelés Repeat Variable Di-residue ou RVD) qui déterminent le nucléotide auquel l'unité se lie. Il est cependant nécessaire que le premier nucléotide reconnu soit une thymine (appelée T0) pour permettre l'activité des TALE.

Le site catalytique est issu de la nucléase Fok1 isolée chez la bactérie *Flavobacterium okeanoikoites*. Cette nucléase fonctionnant en dimère afin de pouvoir créer une cassure sur les deux brins de l'ADN, les TALEN vont toujours par paire et reconnaissent deux séquences d'ADN distantes de 14 à 30 nucléotides (séquence espace). La figure 3 schématise la structure des TALEN.

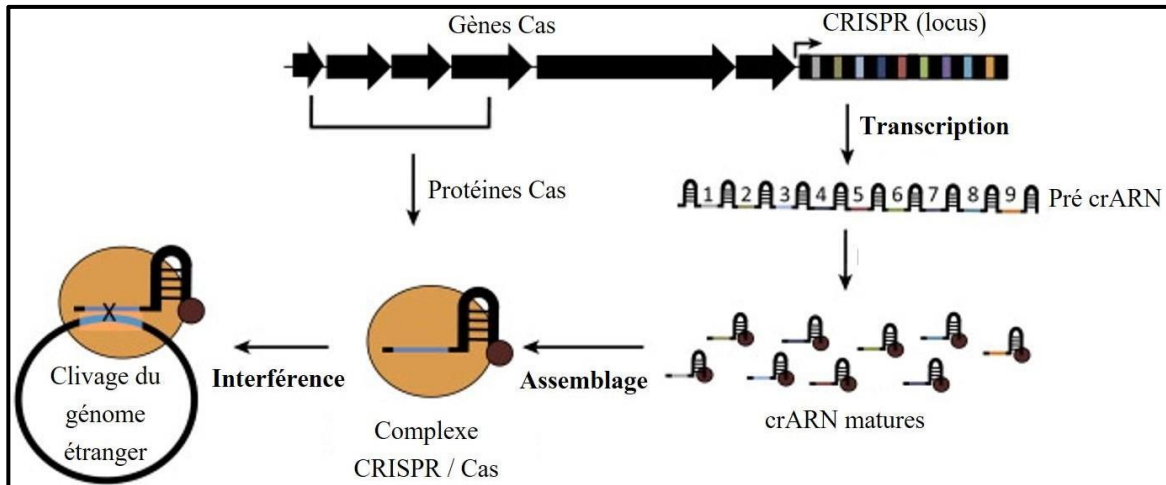


**Figure 3** : Structure et mise en place des TALEN sur l'ADN

Il semblerait que les TALEN soient plus spécifiques que les enzymes en doigts de zinc : leur code de liaison à l'ADN est simple et le nombre des unités de répétition peut être augmenté afin de garantir la spécificité du site de clivage

- **Les CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ou bien (courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées)

Les bactéries transcrivent régulièrement les CRISPR, ces petites séquences d'ADN viral, en ARN. Ces micro-séquences d'ARN sont des copies de fragments du génome viral. Lorsque les copies ARN rencontrent le virus original dans la cellule, le virus est reconnu et les ARN se lient aux séquences virales qui leur sont identiques ou homologues. Ce marquage permet à la protéine Cas9 de couper le génome viral et le rend inoffensif. En résumé, Cas9 est un ciseau moléculaire qui coupe l'ADN à l'endroit où se lie une copie ARN des CRISPR. L'étude du mécanisme moléculaire de CRISPR/Cas9 dans les bactéries a ensuite permis son application en biotechnologie à partir de 2012. Ce qui a attiré l'attention des scientifiques est la capacité du ciseau moléculaire, Cas9, à couper l'ADN à un endroit précis. Cet endroit est déterminé par marquage avec une molécule d'ARN. Dans l'application biotechnologique, un ARN guide (ARNg), identique à la séquence du gène cible, est synthétisé et introduit dans une cellule avec la protéine Cas9. Cet ARNg reconnaît la séquence d'ADN dans le génome de la cellule à modifier par homologie et lie cette séquence. La protéine Cas9 reconnaît ce complexe ARN-ADN et coupe l'ADN. Cette incision dans l'ADN est ensuite utilisée pour générer des mutations, insérer ou enlever des séquences génétiques de différentes longueurs, en partie grâce aux mécanismes naturels de réparation cellulaire. La figure 4 montre le fonctionnement schématique du système CRISPR



**Figure 4 :** Fonctionnement schématique du système CRISPR

Il est donc possible de modifier ces systèmes pour diriger l'action de dégradation vers le site de la mutation responsable de la maladie

#### **4-3 Modification de l'expression des gènes**

Il est aussi possible de modifier l'expression des gènes en les empêchant de s'exprimer ou en forçant leur expression.

##### **1. Extinction génique**

###### **1.1 Interférence de l'ARN (ARN interférant)**

L'interférence de l'ARN est un mécanisme de régulation de l'expression génique présent chez de nombreux eucaryotes. L'interférence de l'ARN provoque la dégradation d'un ARNm cible par une enzyme dirigée par un ARN non codant, complémentaire de l'ARNm cible. Ce mécanisme a été découvert en 1998 par Fire et son équipe

Cette équipe a mis en évidence le potentiel des ARN dans l'extinction génique en injectant des ARN double brin chez des nématodes (*Caenorhabditis elegans*). Le premier microARN a été découvert en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (appelé l'ARN lin-4)

Ces microARN interviennent dans différents processus cellulaires comme la mitose, l'apoptose et le développement des différents tissus (cerveau, cœur, ...) ainsi que dans le mécanisme d'interférence de l'ARN. On en dénombre plus de 500 chez l'Homme et les chercheurs suspectent qu'il en existe plus d'un millier

Les gènes des microARN appartiennent à la partie non codante du génome. Un premier primicroARN est transcrit à partir du gène microARN par l'ARN polymérase II (Pol II). Il est ensuite clivé dans le noyau en pré-microARN par un complexe enzymatique (Drosha et DGCR8) puis exporté dans le cytoplasme via le transporteur Exp5. Il est alors à nouveau clivé par une enzyme spécifique appelée « Dicer » (complexée avec la protéine TRBP qui se lie au pré-microARN) pour devenir le microARN définitif (20 à 25 nucléotides).

## **1.2 ARN anti-sens**

ARN monocaténaire qui peut se lier par complémentarité à un ARN messager, donc de sens opposé, et bloquer ainsi la traduction de cet ARNm (blocage mécanique des ribosomes). Les ARN anti sens peuvent être des éléments naturels de régulation comme ils peuvent être également obtenus par génie génétique. Cette méthode est cependant peu spécifique et n'a pas un taux de réussite très élevé car trop hasardeuse.

## **1.3 Ribozymes et ADNzymes (ou désoxyribozymes)**

Sont des molécules d'ARN catalytiques qui reconnaissent leur ARN cible de manière hautement spécifique de séquence. Ils peuvent donc être utilisés pour inhiber l'expression de gènes délétères (par clivage de l'ARNm cible) ou même réparer des ARN cellulaires mutants. Des cibles telles que les ARNm d'oncogènes (résultant de mutations de bases ou de translocations chromosomiques), les génomes et les transcrits viraux (virus de l'immunodéficience humaine de type 1 [VIH-1]) sont des cibles idéales pour de tels agents à séquence spécifique

## **1.4 Nucléases programmables**

Les nucléases programmables sont des enzymes qui lisent une séquence cible de quelques paires de bases d'ADN dans le génome puis coupent à cet endroit comme des ciseaux. Les nucléases peuvent être programmées pour reconnaître une séquence choisie du génome. Les scientifiques peuvent donc choisir quel gène couper et quelle longueur couper dans le génome de l'organisme de leur choix.

Les nucléases provoquent une coupure des deux brins d'ADN qui déclenche à son tour un mécanisme de réparation cellulaire de l'ADN qui peut être de deux types.

Le premier reconstitue presque sans erreur la séquence d'origine. Le deuxième recolle les brins en faisant des erreurs, soit par rajout ou suppression de quelques lettres (les bases de l'ADN) ou alors de plus longues séquences. Il est difficile de contrôler quel mécanisme est utilisé, mais il est décisif pour les effets de la modification. Le mécanisme le plus utilisé par la

cellule est celui qui commet des erreurs. Il est utilisé par les scientifiques pour muter ou inactiver les gènes. La séquence du gène coupé peut être inactivée en insérant ou en enlevant des bases individuelles ou remplacée par une autre séquence fonctionnelle (p. ex. un autre gène). Plusieurs types de nucléases sont utilisés avec des précisions et des effets secondaires divers.

### 5.1 Les aptamères

Les aptamères sont de petites séquences d'acides nucléiques, ADN ou ARN, sélectionnées in vitro pour leur capacité à se lier avec une forte affinité à une cible spécifique. Dans le domaine de la biotechnologie, les aptamères suscitent un intérêt croissant en raison de leur rôle fondamental en recherche et en médecine. Ces courts oligonucléotides synthétiques d'ADN ou d'ARN sont conçus pour se lier spécifiquement à une cible donnée. Leur intérêt réside dans leur capacité à remplacer les anticorps traditionnels et autres ligands d'affinité. Cette propriété offre des avantages significatifs en termes de coût, de stabilité et de spécificité.

En médecine, les aptamères offrent un potentiel énorme pour le développement de nouvelles thérapies. Leur capacité à se lier spécifiquement à des cibles biologiques sans susciter de réponses immunitaires majeures rend les aptamères particulièrement attractifs comme agents thérapeutiques. Des recherches sont en cours pour exploiter les aptamères dans divers contextes, incluant la thérapie anticancéreuse, la régulation des processus inflammatoires et le traitement des maladies virales.

## 2. Expression forcée

L'expression forcée est le fait de provoquer l'expression de certains gènes d'un individu en insérant des promoteurs. On prendra ici l'exemple des thalassémies  $\beta$ . Les thalassémies  $\beta$  sont des anémies héréditaires dues à une production réduite ou absente de chaînes  $\beta$ -globines qui composent l'hémoglobine (formule :  $\alpha_2\beta_2$ ). De ce fait, les chaînes  $\alpha$ -globines sont en surnombre et ne peuvent pas toutes se lier à des chaînes  $\beta$  ; elles précipitent sous forme d'homotétramères  $\alpha_4$  et empêchent la maturation des précurseurs des hématies, ce qui conduit à leur apoptose et donc à une anémie. Le phénotype des malades dépend de leur génotype (homozygotes ou hétérozygotes pour une mutation du gène codant pour la chaîne  $\beta$ ) mais aussi de leur capacité à produire des chaînes  $\gamma$ -globines, présentes lors de la vie fœtale. En effet, les chaînes  $\gamma$  sont capables de se lier aux chaînes  $\alpha$  libres et de former l'hémoglobine fœtale (formule :  $\alpha_2\gamma_2$ ), et ainsi de diminuer la gravité des symptômes de la maladie.

Dans le traitement des thalassémies  $\beta$  par thérapie génique, une des pistes poursuivies est l'insertion d'une cassette génique comportant le gène de la  $\gamma$ -globine ainsi que son promoteur spécifique dans le génome des personnes malades. Cela provoquerait la production de cette globine par les cellules transduites et permettrait de réduire les symptômes de la maladie. Les essais cliniques in vitro sont prometteurs

## **2- Modalités d'administration de la thérapie génique**

### **5-1 In vivo**

L'administration in vivo consiste à injecter le vecteur par voies intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire directement chez l'hôte. Le principal problème est alors le contrôle de l'adressage de la séquence d'ADN d'intérêt uniquement dans les cellules cibles. Cette voie permettrait néanmoins l'utilisation de la thérapie génique à grande échelle et à moindre coût. Les études sur les vecteurs cherchent donc à les rendre utilisables et efficaces en thérapie in vivo. On peut également injecter le vecteur directement dans le tissu cible. On appelle cette administration in situ. Cependant, le taux de transfection reste faible car le vecteur diffuse peu, ce qui est le plus souvent incompatible avec une guérison complète, sauf dans le cas de tumeur localisée

Lors d'administrations in vivo, il est nécessaire de faire pénétrer le gène d'intérêt uniquement dans les cellules cibles et donc de pouvoir cibler l'utilisation de la thérapie génique. Le ciblage peut être réalisé à plusieurs niveaux :

- **Au niveau de la séquence d'ADN** : Il est possible d'associer un promoteur tissu-spécifique au transgène. Malheureusement, peu de promoteurs spécifiques d'un seul tissu sont connus et l'expression qui suit l'utilisation d'un tel vecteur est souvent limitée en quantité, parfois trop faible pour avoir un effet thérapeutique.

- **Au niveau des vecteurs** : Certains vecteurs, comme les virus, ont un tropisme naturel mais il est souvent très large. La plupart des vecteurs sont modifiables afin de leur faire porter des protéines de surface ciblant spécifiquement un tissu (ou pseudotypage).

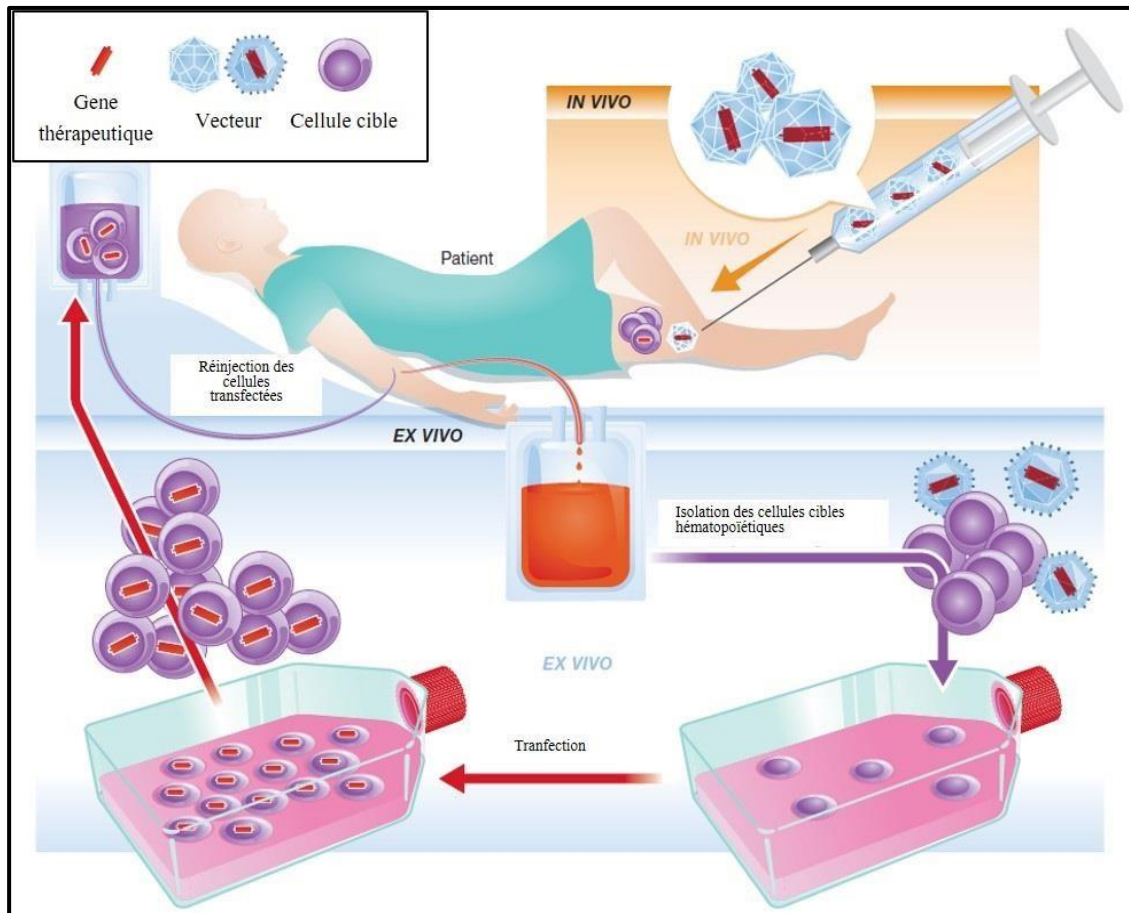
### **5-2 Ex vivo**

L'administration ex vivo se déroule en trois étapes :

- Prélèvement des cellules de l'hôte (selon la maladie, des cellules sanguines ou de leurs précurseurs, qui seront réinjectées dans la circulation ou des fibroblastes qui seront greffés comme un néo-organe),
- Transfection en culture in vitro des cellules prélevées,

- Réinjection ou greffe chez le sujet des cellules transfectées.

Cette administration permet de cibler la thérapie génique uniquement vers les cellules ou le tissu à corriger et d'éviter ainsi des foyers ectopiques d'expression du transgène. Elle empêche aussi toute réaction immunitaire au vecteur puisqu'il n'est pas en contact direct avec l'organisme. La figure 5 présente le concept de thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*



**Figure 5 :** Concept de thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*