XII – PHARMACOLOGIE GENETIQUE

& THERAPIE GENIQUE

Daniel Scherman

Plan :

Introduction

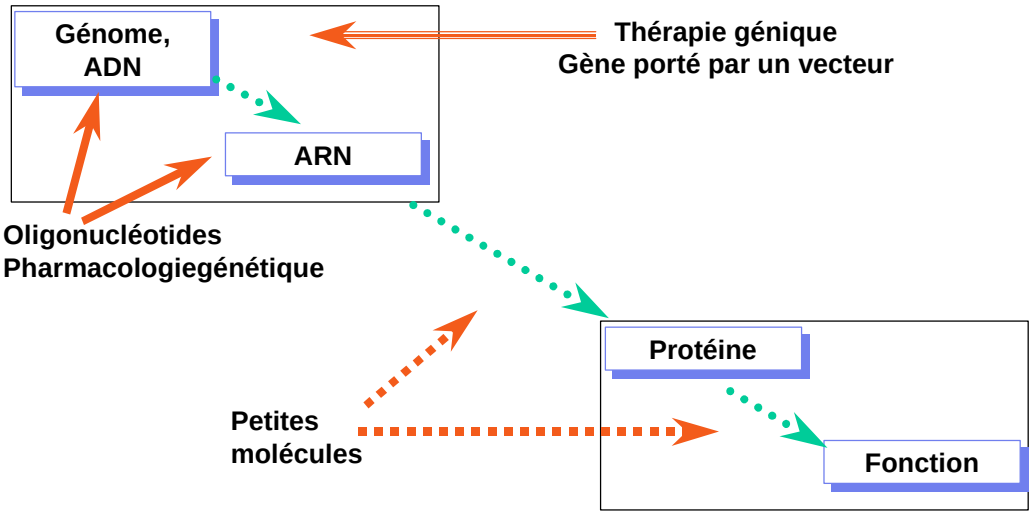
1. Pharmacologie génétique
2. Thérapie génique : rationnel
3. Stratégies de thérapie génique anticancéreuse
4. Vecteurs d'expression
5. Vecteurs d'administration
6. ADN plasmidique « nu » *in vivo* et méthodes physiques de transfert de gène.
7. Thérapie *ex vivo* de l'immunodéficience sévère combinée liée au chromosome X: la première « success story » de la thérapie génique
8. Réparation de l'ADN
9.

Introduction

Les progrès considérables de la biologie et de la génétique moléculaires se traduisent par l'élucidation de la séquence d'un nombre croissant de gènes. Ceci a fait naître l'idée, dans les années 1980, d'une pharmacologie ayant l'ADN génomique ou les ARN pour cibles, et qui utiliserait des oligonucléotides synthétiques de petite taille : c'est le concept de ***la* pharmacologie génétique**.

Parallèlement sont apparues les premières tentatives d'utilisation d'ADN « codants » pour des ARN afin d'obtenir une fonction thérapeutique au sein d'une cellule. Dans ce paradigme de **thérapie génique**, il s'agit d'utiliser l'ADN codant comme un médicament qui, une fois parvenu dans le noyau cellulaire, permet la synthèse continue ou contrôlée de l'agent thérapeutique effectif, qui peut être soit le transcrit ARN, soit la protéine traduite à partir de cet ARN.

Figure XII-1 : Pharmacologie génétique et thérapie génique



XI-1. Pharmacologie génétique

La grande majorité des médicaments actuels ont pour cible les protéines, mis à part certaines exceptions, telles que les antitumoraux cytotoxiques formant des adduits sur l'ADN. L'idée de la pharmacologie génétique est de concevoir des molécules qui agissent sur l'expression d'une protéine **en exerçant directement leur effet sur le gène qui contrôle l'expression de cette protéine**. Pour cela, on utilise la chimie de reconnaissance des acides nucléiques, ce qui permet d'envisager, en théorie, une spécificité de séquence absolue liée à l'unicité des séquences génétiques. A cause de la fragilité des acides ribonucléiques, tous les acides nucléiques synthétiques utilisés sont des **acides oligodésoxyribonucléiques**. C'est pourquoi on les dénomme parfois plus simplement et incorrectement « oligonucléotides », sans que cela ne prête à confusion.

Interaction d'un acide oligodésoxyribonucléique avec une séquence cible.

Dans sa conception la plus naturelle, un acide oligodésoxyribonucléique ou oligodésoxyribonucléotide (**ODN**) se fixant sur un autre oligonucléotide utilise l'appareillement de Watson Crick. Un ODN « antisens » portant une séquence complémentaire permettant la liaison hydrogène Watson-Crick peut avoir plusieurs cibles potentielles sur un ADN ou son transcrit ARN:

- ***Cible ADN*** : un oligonucléotide antisens peut, en théorie, se fixer sur le brin d'ADN chromosomique dont il est complémentaire par « invasion de brin ». On peut alors espérer bloquer la transcription par les ARN polymérases. L'oligonucléotide antisens peut être ciblé dans la région située immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription ou au niveau de la région transcrite (Fig. XII-2). On pourrait par ailleurs, en théorie aussi, obtenir de cette manière le blocage ou le ralentissement de la réplication de l'ADN et obtenir ainsi un effet antiprolifératif. De fait, l'ADN ne représente pas la meilleure cible pour une stratégie antisens, et c'est **la fixation sur l'ARN** qui conduit aux effets biologiques les plus importants.

- Si la cible de l'oligonucléotide est l'ARN messager, la stratégie « antisens » vise alors à **bloquer la traduction**. Cet effet peut être obtenu avec un antisens se fixant au niveau de la coiffe de l'ARN messager. Alternativement, des antisens se fixant sur un site d'épissage ont pu **bloquer la maturation** de l'ARN prémessager en ARNm épissé. Enfin, sur le messager épissé, la séquence cible peut être, outre la coiffe, l'AUG initiateur de la traduction ou n'importe quel élément de séquence (Fig. XII-2).

L'efficacité biologique d'oligonucléotides antisens à inhiber la traduction est remarquable. Une concentration micromolaire en ODN conduit ainsi, *in vitro* sur cellules en culture, à la disparition quasi-complète de la protéine dont l'ARN est la cible de l'antisens. Des effets ont aussi été décrits *in vivo*, ce qui représente une perspective intéressante pour créer facilement des invalidation temporaires de gène pour des études physiologiques et pharmacologiques.

Comment expliquer cette efficacité des ODN? Pour les ODN synthétiques à liaison internucléosidique phosphodiester ou phosphorothioate (voir Fig. XII-6), un processus heureux semble être responsable de l'inhibition de la transcription : l'hybridation de l'ODN sur l'ARNm crée localement un hétéroduplexe ADN/ARN. Or, de tels hétéroduplexes sont dégradés dans les cellules par la **RNAse H**, enzyme dont c'est justement la fonction cellulaire car de tels hétéroduplexes sont formés et dégradés au niveau de la fourche de réplication. L'ODN est alors libre de se fixer sur un autre ARNm et d'induire sa dégradation. L'oligodésoxyribonucléotide, qui est un petite molécule d'ADN, agit donc ici comme un

catalyseur régénérable de dégradation des ARNm reconnus par la complémentarité Watson-Crick.

Fig. XII-2 Site de fixation d'un oligodésoxyribonucléotide antisens

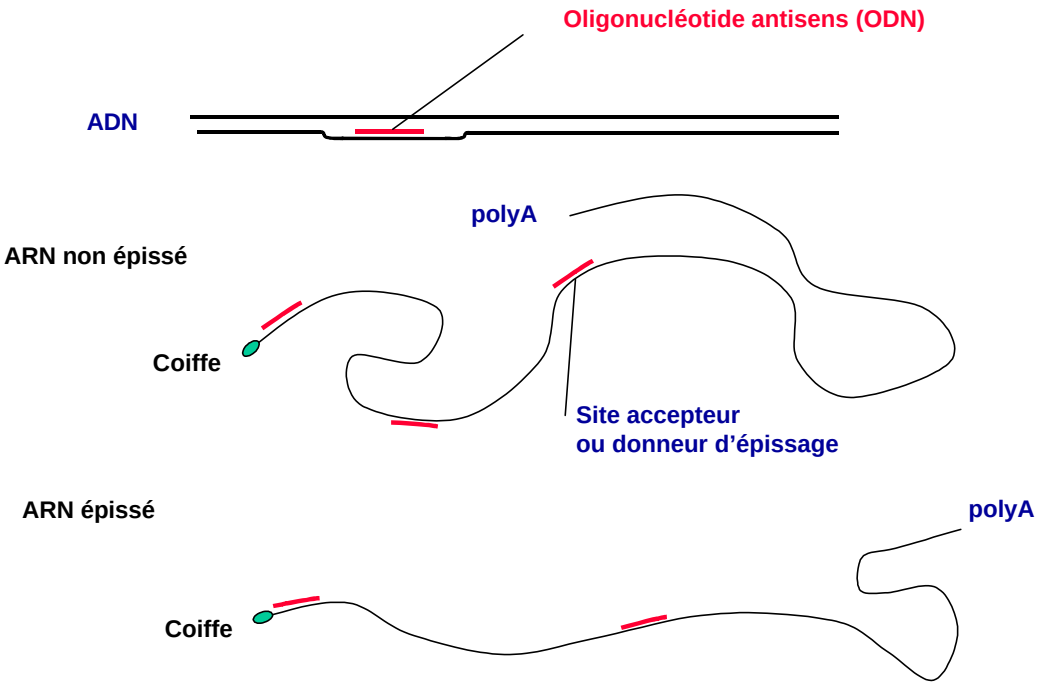
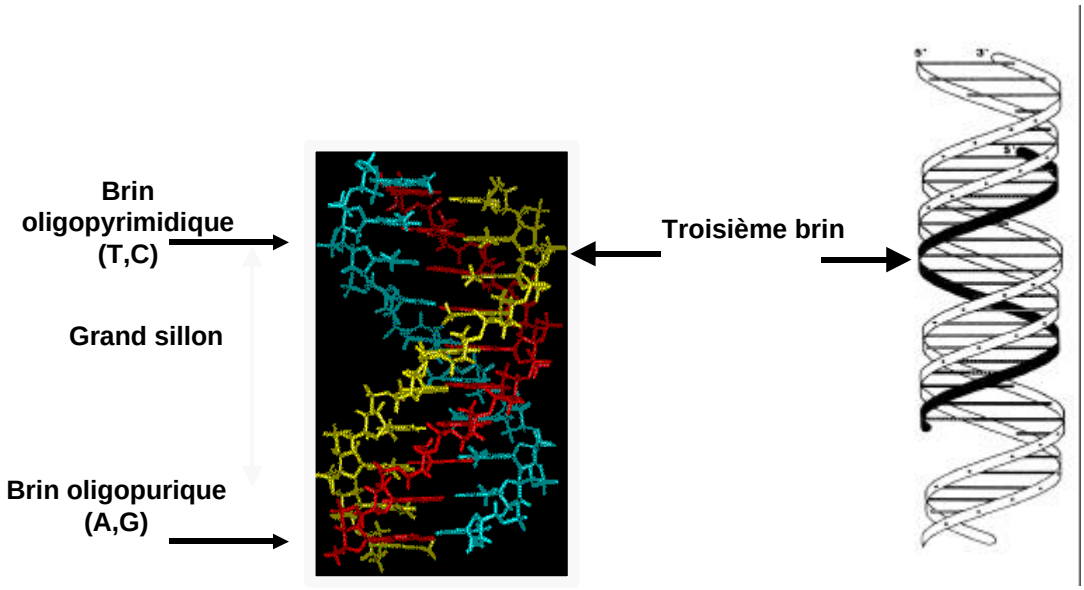


Fig. XII-3 Triples hélices d'ADN



Oligonucléotides formant triple hélice

Des oligonucléotides peuvent être conçus pour se fixer sur une double hélice d'ADN. Une telle approche est nécessaire si l'on veut, par exemple, moduler la transcription d'un gène en se fixant sur son promoteur. La formation d'une triple hélice s'effectue par fixation d'un troisième brin oligodésoxyribonucléotidique dans le grand sillon de l'ADN (Fig. XII.3). Cette fixation est rendue possible par les **liaisons hydrogène de Hoogsteen** présentées dans la figure XII.5. On voit sur cette figure que **seules les bases puriques G et A** sont capables de former, en plus d'une liaison de Watson-Crick, des liaisons hydrogène de Hoogsteen. Le second brin d'ADN sur lequel s'hybride le troisième brin doit donc être, en règle générale, formé uniquement de purines. Il y a peu de séquences naturelles **homopuriques** assez longues sur l'ADN chromosomique pour former des triples hélices stables, ce qui rend cette stratégie assez difficile à mettre en œuvre. Néanmoins, des séquences homopuriques ont été identifiées dans certains virus, dont le virus HIV, ce qui rend la stratégie triple hélice attractive pour le développement de produits antiviraux à forte sélectivité d'action.

On peut largement raffiner et diversifier les approches triple hélice. Par exemple, certaines équipes ont conçu des « pinces » à ARN ou ADN simple brin. Dans ce système, l'oligonucléotide se fixe en premier lieu en Watson-Crick comme un antisens, puis il se referme sur cette double hélice en formant une triple hélice. De telles pinces ont une forte affinité pour leur cible.

Fig. XII- 4 : Pince formant triple hélice

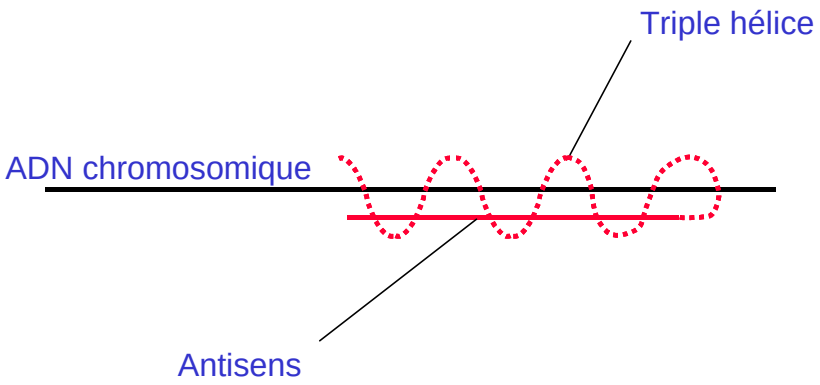
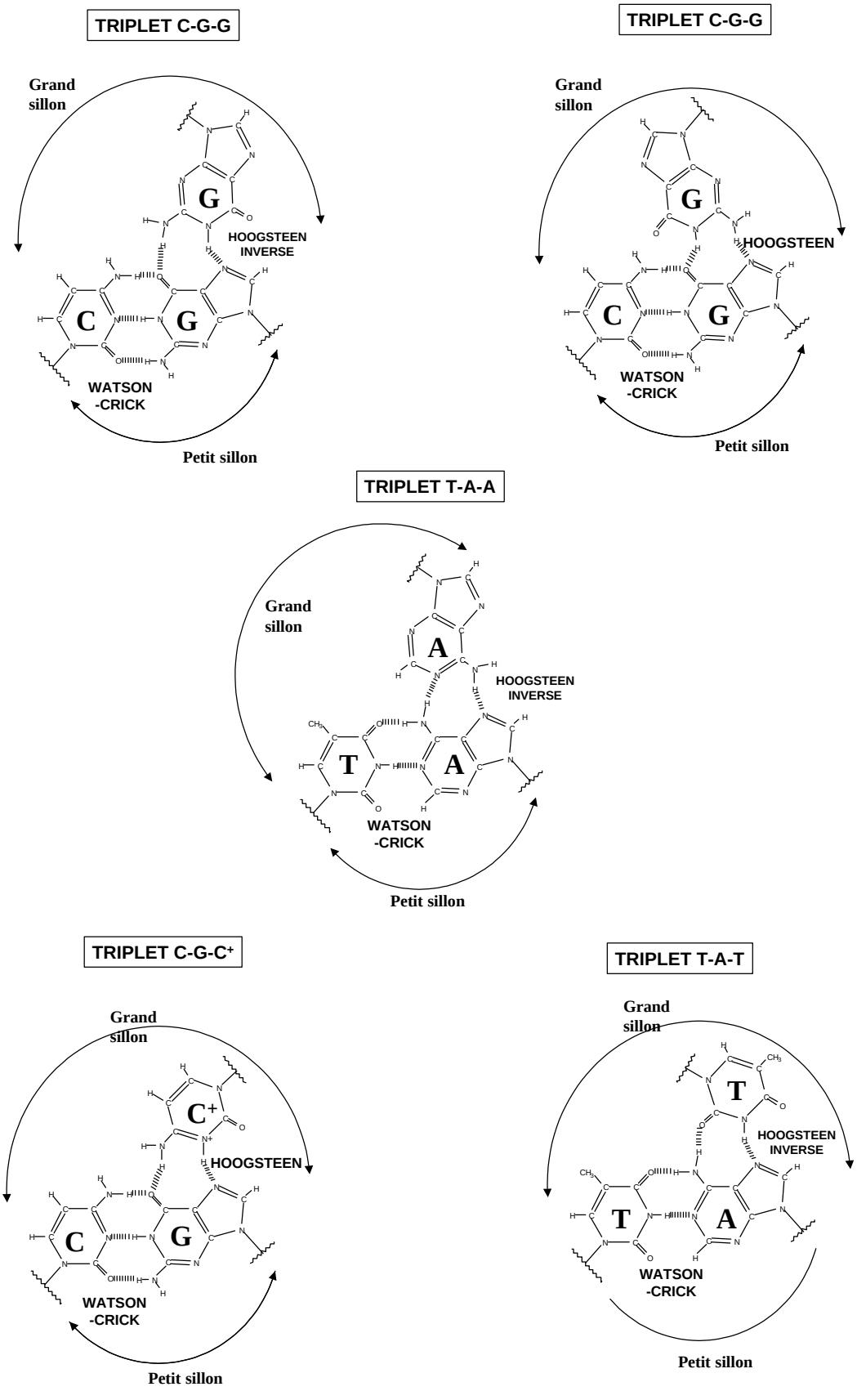


Fig. XII-5 : Les différents triplets de Hoogsteen permettent la formation de triple hélices



Chimie et Biodisponibilité des oligonucléotides synthétiques

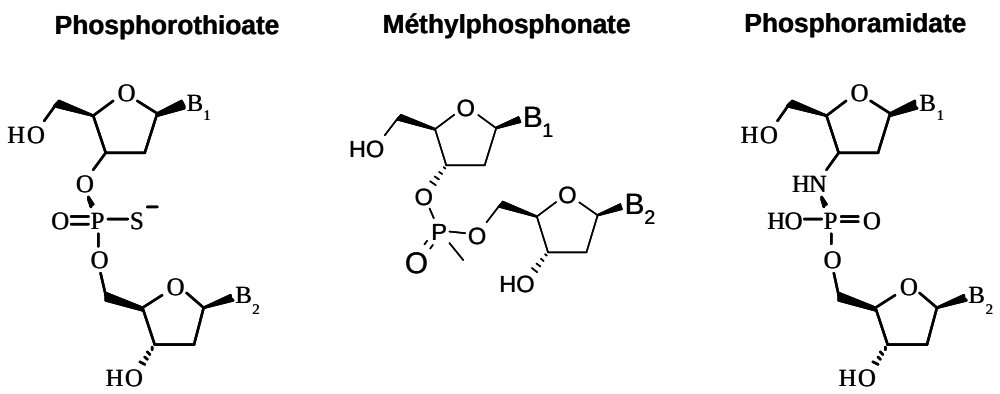
Les oligonucléotides classiques traversent mal les membranes cellulaires, car ce sont des polyanions hydrophiles du fait des liaisons internucléotidiques phosphodiesters. De plus, les ODN phosphodiesters sont rapidement dégradés *in vivo* par des estérases présentes dans le sérum. Enfin, ils sont rapidement éliminés de la circulation par filtration rénale. De très nombreuses variantes chimiques des oligonucléotides ont été imaginées pour répondre à ces problèmes : différents anomères de l'hétérocycle ribosyl, différents hétérocycles, etc..

La chimie la plus diversifiée a été réalisée sur la liaison internucléosidique entre sucres riboses. En remplacement de la liaison **phosphodiester**, on a introduit (Fig. XII-6)

- La liaison **phosphorathioate**, résistant aux nucléase et conduisant à de très bons résultats en utilisation comme antisens,
- La liaison **méthylphosphonate**, qui confère aux ODN une lipophilie accrue, visant à améliorer leur passage transmembranaire,
- La liaison **phosphoramidate**, qui conduit à des triples hélices plus stables,

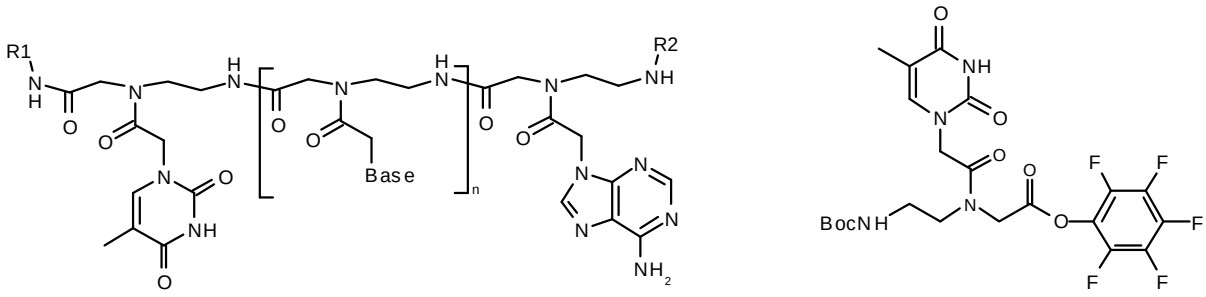
Ces modifications ont parfois été introduites de manière **chimérique** : par exemple, un ODN phosphodiester en son fragment central pour une meilleure activation de la RNAse H, couplé en 5' et 3' par de courtes extrémités phosphorothioate pour améliorer la stabilité vis à vis de exonucléases.

Figure XII-6 : Principaux oligonucléotodes modifiés



Enfin, une approche très fructueuse a consisté à fabriquer des « **acides peptidonucléiques** », dans lesquels les bases sont reliées entre elles par des « espaceurs » comportant des liaisons amide, ce qui permet d'utiliser la technologie des synthétiseurs de peptide (Fig. XII-7). De tels ***PNA*** (peptidonucleic acids) forment des double hélices et des triple hélices très stables. En effet, ils sont dépourvus des charges anioniques qui, par répulsion électrostatique, diminuent la stabilité des hybrides d'acides nucléiques comportant des phosphodiesters. Ceci leur permet de se fixer sur l'ADN chromosomique en réalisant une invasion de brin.

Figure XII-7 : PNA et brique élémentaire de synthèse



Les oligodésoxyribonucléotides ont-ils tenus leurs promesses ?

Si beaucoup d'enthousiasme a accompagné les premières tentatives d'utilisation pharmaceutique des oligonucléotides antisens ou formant triple hélice, les progrès ont été ralentis par les facteurs suivants :

- la dégradation et l'élimination rapides des ODN *in vivo*, ce qui représente donc une pharmacocinétique relativement défavorable,
- comme cela a déjà été dit, la mauvaise pénétration cellulaire des ODN,
- les nombreux effets non spécifiques des ODN, en particulier avec les dérivés plus hydrohobes tels que les phosphorohioates et les méthylphosphonates.

Cependant, une efficacité *in vivo* suffisamment concluante a été obtenue *in vivo* avec un ODN de type phosphorothioate ayant une séquence antisens spécifique d'une protéine du **cytomégalovirus humain**. Cet antisens est utilisé pour soigner les infections occulaires au cytomégalovirus rencontrées chez les patients atteints de SIDA. D'autres applications des ODN sont actuellement poursuivies, comme par exemple l'utilisation dans le cancer. Le projet est d'inhiber la traduction de l'oncogène ***ras***. La sélectivité pharmacologique provient de l'existence d'une mutation activatrice dans la protéine *ras* oncogénique par rapport au protooncogène *ras*. Ceci permet de construire un antisens s'hybridant uniquement sur l'ARNm du *ras* oncogénique.

Enfin, d'importants progrès ont été récemment obtenus par l'usage d'ODN modifiés à leur extrémité. On associe à ces ODN comportant une partie nucléotidique pour la liaison spécifique à l'ADN, soit un ligand non spécifique de l'ADN pour améliorer la stabilité des hydrides antisens ou triple hélice, soit une molécule antitumorale telle qu'un inhibiteur de topoisomérase (Prof. C. Hélène, Paris), soit enfin une molécule protégeant de l'attaque par les nucléases.

XII-3 Thérapie génique : rationnel

La thérapie génique repose sur **le transfert d'un gène thérapeutique**. Elle fut au départ considérée pour traiter les maladies génétiques induites par la déficience d'un seul gène, les **maladies monogéniques**. Ces maladies regroupent un vaste ensemble de pathologies qui peuvent être soit bénignes (le daltonisme par exemple), soit graves et souvent léthales (chorée de Huntington, mucoviscidose, etc. ; Fig.XII-8).

Fig. XII-8 : Quelques maladies monogéniques

Maladie	*Gène*
Immunodéficience sévère	ADA
Hémophilie A	Facteur VIII
Hémophilie B	Facteur IX
Anémie falciforme	β-globuline
Thalassémie	β-globuline
Maladie de Gaucher	Glucocérébrosidase
Mucoviscidose	CFTR
Maladie de Duchenne	Dystrophine
Hypercholestérolémie familiale	Récepteur des LDL

Pour qu'une maladie génétique soit candidate à une thérapie génique, il faut :

- une certaine **connaissance** de la maladie (gène connu, cloné, ...)
- mutation sur **un faible nombre de gènes** (un seul gène de préférence)
- **pas d'autre thérapeutique efficace**

Pour ces maladies génétiques, une **thérapie protéique** basée sur l'administration de protéines naturelles ou recombinantes (par exemple un facteur de coagulation) ou une **thérapie cellulaire** basée sur l'administration de cellules (transfusion de globules rouges pour le traitement de l'anémie falciforme en phase aiguë) ne sont employables que dans seulement une minorité de cas. En effet, pour la plupart des maladies monogéniques, on ne peut pas fournir la protéine thérapeutique de remplacement, et ceci pour plusieurs raisons :

- instabilité de cette protéine,
- difficulté de la produire,
- ou tout simplement parce que la protéine déficiente est intracellulaire, et qu'il n'est actuellement pas possible d'administrer la protéine à l'intérieur des cellules.

Ce dernier point illustre l'incontournable avantage du transfert de gène thérapeutique : si l'on fournit à un tissu une copie normale d'un gène défectif, on contourne le problème de l'administration intracellulaire de protéines complexes, puisque **le produit protéique du transgène est synthétisé dans la cellule par le biais de machinerie biosynthétique**.

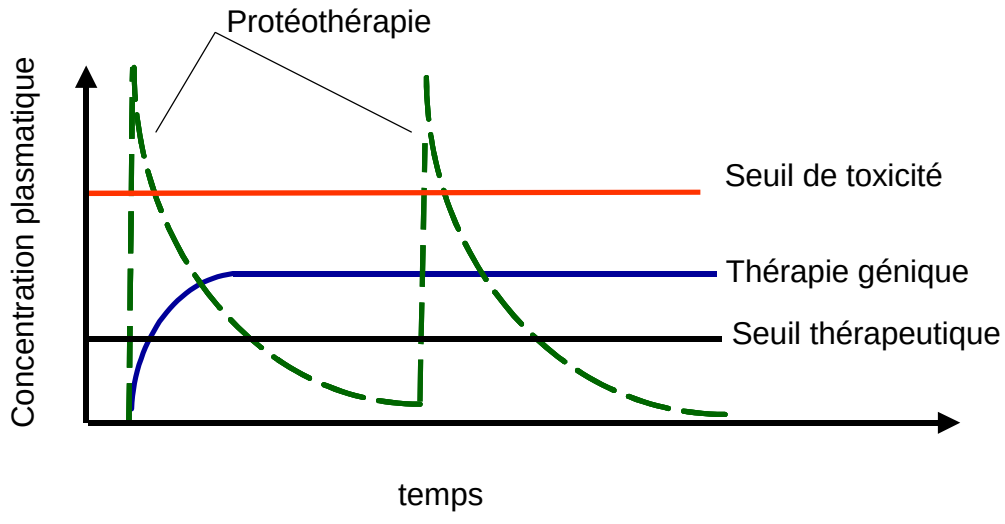
De plus, même lorsqu'une protéine exogène peut être utilisée, la thérapie génique présente plusieurs avantages par rapport à l'injection de protéines recombinantes ou purifiées à partir de donneurs :

- d'une part, la protéine produite à partir du gène transféré (le transgène) est soumise aux processus de modifications post-transcriptionnelles de l'hôte. En particulier, le profil de glycosylation est strictement celui du patient, ce qui assure une meilleure biocompatibilité,

- d'autre part, la thérapie génique présente un avantage pharmacocinétique indéniable, puisque l'on peut exprimer la protéine de manière continue, permettant ainsi une **couverture thérapeutique constante**, dénuée du pic de concentration plasmatique observé au moment de l'injection d'une protéine (Fig. XII-9).

- Enfin, un dernier point peut être moins crucial mais néanmoins important concerne le confort du malade : l'administration unique ou répétée rarement d'un transgène est beaucoup mieux tolérée par le malade qu'une administration quotidienne, voir pluriquotidienne, comme c'est le cas actuellement pour l'insuline dans le traitement du diabète.

Fig. XII-9 : Comparaison pharmacinétique entre protéothérapie et thérapie génique
Cette comparaison est effectuée dans le cas d'un traitement exigeant la présence d'une protéine dans le sang. Le « transgène » thérapeutique est administré à un tissu capable de sécréter le produit dans la circulation.



Extension des applications du transfert de gène thérapeutique aux maladies acquises

Paradoxalement, c'est sans doute pour les maladies somatiques **non génétiques** que la thérapie génique pourrait trouver le plus grand nombre d'applications. Prenons l'exemple d'un gène codant pour une protéine **sécrétée** dans la circulation sanguine. Il est possible de transférer un gène dans des organes richement vascularisés, tel que le cœur ou le muscle squelettique, organes capables de sécréter le produit protéique du transgène s'il est muni d'une séquence « signal » de sécrétion. Ceci possède de très nombreuses applications potentielles:

- pour le traitement de la pathologie ischémique par **néoangiogénèse** (néovascularisation), en faisant sécréter un facteur de croissance pour les cellules vasculaires,

- pour le traitement des maladies neurodégénératives périphériques par sécrétion d'un facteur neurotrophique ; par exemple, la sécrétion locale de la neurotrophine 3 par le muscle transfecté est envisagée pour le traitement la sclérose latérale amyotrophique,

- pour la vaccination, le muscle transfecté exprimant une ou plusieurs protéines immunodominantes d'un virus ou d'un parasite,

- pour la sécrétion dans la circulation systémique de protéines thérapeutiques telles que :
  - l'érythropoïétine, pour le traitement de l'insuffisance rénale chronique
  - les facteurs de coagulation (maladie monogénique),
  - les enzymes déficientes dans les maladies métaboliques génétiques telles que celles du métabolisme du propionate ou du méthylmalonate (maladie monogénique),
  - des cytokines anti-inflammatoires pour le traitement de pathologies chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde ou l'asthme,
  - l'α1-antitrypsine pour le traitement de l'emphysème pulmonaire du sujet jeune lié à une mutation du gène de l'α1-antitrypsine, etc..

On remarque que dans cette énumération les maladies monogéniques représentent une minorité.

XII-4. Stratégies de thérapie génique anticancéreuse

Le cancer représente, avec les maladies virales, le domaine où s'expriment le plus remarquablement les possibilités avantageuses du transfert de gène pour la production de protéines thérapeutiques agissant au niveau **intracellulaire**. La figure XII-10 résume les différentes approches imaginées en stratégie de thérapie génique antitumorale, dont de nombreuses ont été testées dans des essais cliniques chez l'homme :

Fig. XII-10 : Thérapie génique et cancer : stratégies actuelles

1. Anti-oncogènes ⇒ p53
2. Inhibition d'oncogènes
   - ⇒ Antisens
   - ⇒ Ribozymes
   - ⇒ Anticorps simple chaîne
   - ⇒ Mutants transdominants
3. Inhibition de l'angiogénèse ⇒ Angiostatine, endostatine
4. Stimulation de l'immunité ⇒ Cytokines (IL2, GM-CSF)
5. Vaccination thérapeutique ⇒ Antigènes tumoraux
6. Gènes toxiques conditionnels ⇒ HSV TK + Ganciclovir

Plusieurs de ces approches conduisent à la **mort cellulaire programmée** (**apoptose**) des cellules tumorales Même si toutes les cellules tumorales ne sont pas transfectées ou transduites, on constate un effet général sur la tumeur. Cet **effet de voisinage** est d'origine multiple, les éléments importants étant sans doute l'activité proinflammatoire locale liée à la mort de nombreuses cellules (réponse immune non spécifique), ainsi que la libération d'antigènes tumoraux par les cellules mortes, antigènes qui activent la réponse immunitaire spécifique contre la tumeur. Le rationnel de ces différentes approches est détaillé ici .

1. Transfert d'un antioncogène : On a pu constater que l'expression **intracellulaire** de l'anti-oncogène p53 « sauvage » (i.e. non muté) conduisait à la mort apoptotique des cellules tumorales exprimant une forme mutée défective de la protéine p53. Plusieurs essais cliniques de thérapie génique chez l'homme utilisent ce concept.

2. Inhibition d'un oncogène : ceci conduit à l'apoptose de la cellule tumorale, comme dans le cas de la stratégie utilisant les oncogènes. On peut utiliser pour cela de nombreuses astuces.

- Un **antisens génétique** : dans ce cas, l'agent effecteur thérapeutique n'est pas une protéine, comme dans le cas de la protéine p53, mais l'ARN transcrit à partir de l'ADN thérapeutique. Cet ARN génétique antisens s'hybride à l'ARNm de l'oncogène et en bloque la traduction (ne pas confondre ici les ARN antisens *génétiques* avec les ODN de synthèse à activité antisens présentés dans la section « pharmacologie génétique ») .

- Alternativement, on peut concevoir un **ribozyme**, ARN catalytique qui dégrade sélectivement l'ARNm de l'oncogène (Fig. XII-11).

- Des transgènes codant pour des **anticorps intracellulaires** se fixant sur un oncogène on été décrits dans le cas de l'oncogène *ras*. Ces anticorps se fixent sur l'oncogène et inactivent sa fonction, illustrant ainsi le nouveau concept de **vaccination intracellulaire,** permise uniquement par un transfert de gène (Fig. XII-12).

- Enfin, on peut faire produire à partir du transgène des **mutants transdominants,** qui neutralisent ou corrigent l'activité d'un oncogène, par exemple en se fixant sur les partenaires de l'oncogène qui interviennent dans la transduction du signal oncogénique.

Fig. XII-11 : Ribozyme à tête de marteau

Ce ribozyme, l'un des plus efficace, a été très étudié. Les extrémités 3' et 5' sont choisies pour former une séquence complémentaire en Watson-Crick d'une séquence spécifique de l'ARNm de l'oncogène. Ceci permet au ribozyme de se fixer ***sélectivement*** *sur cet ARNm. Le ribozyme est codé par le gène thérapeutique administré. Cette stratégie « ribozyme » est aussi utilisée dans le cadre de protocoles de thérapie génique anti-HIV.*

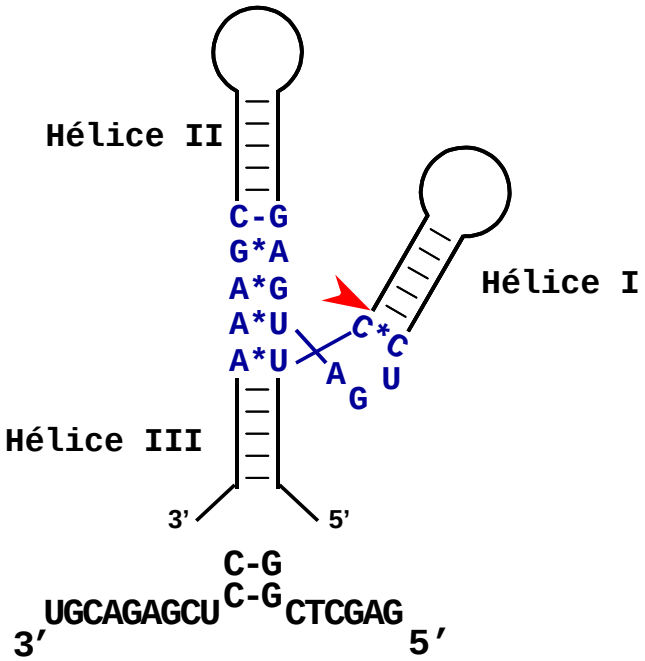
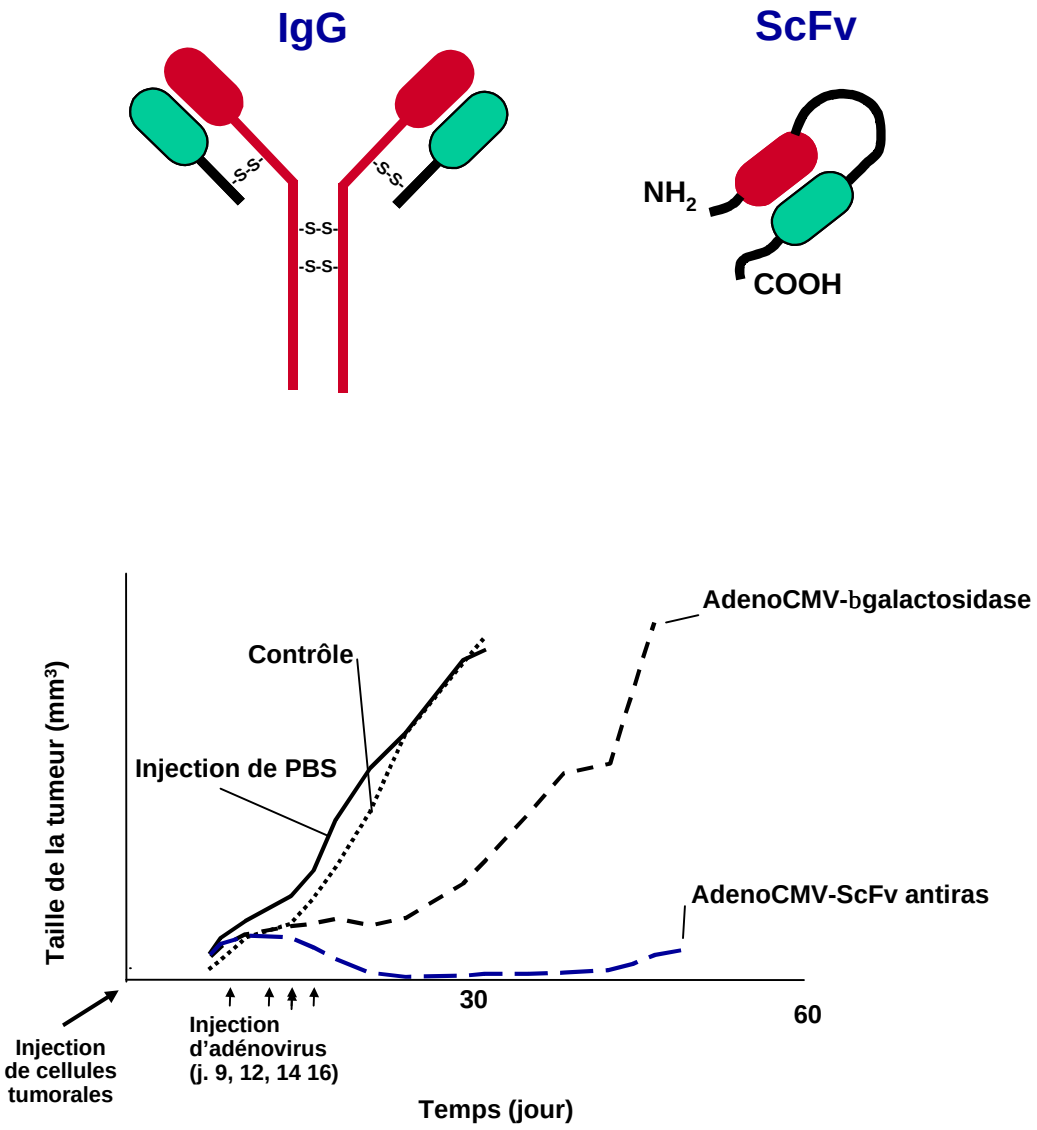


Fig. XII-12 : Anticorps simple chaîne (ScFv) et immunisation cellulaire

Un anticorps simple chaîne est constitué des deux fragments variables d'une immunoglobuline (celui porté par la chaîne lourde et celui porté par la chaîne légère), qui sont rassemblés en une seule gène (ScFv : single chain variable fragment).

On a construit un ScFv qui reconnaît l'oncogène ras et l'inactive dans les cellules. Le gène de ce ScFv, dénommé Y28, est introduit dans un vecteur adénoviral défectif et injecté dans une tumeur. Plus de 50% des souris ont une rémission complète de la tumeur.

On remarque qu'un adénovirus de contrôle comportant le gène de la béta-galactosidase a, lui aussi, un effet inhibiteur sur la croissance tumorale, quoique à un niveau plus faible. Cela est attribable à l'inflammation locale associée à l'administration du virus. L'inflammation est ici un élément positif, puisqu'elle a un effet antitumoral. Cependant, les propriétés inflammatoires des adénovirus représentent un obstacle majeur à leur utilisation en thérapie génique.



Modèle HCT 116 de carcinome de colon humain dans la souris nune (moyenne de 10 animaux par condition)

3. D'autres approches de thérapie génique antitumorale portent sur la sécrétion de **facteurs antiangiogéniques**. La cible n'est pas dans ce cas la cellule tumorale elle-même, mais la v**ascularisation tumorale**. En effet, pour croître, une tumeur a besoin de développer son réseau capillaire : on a observé sur modèle expérimental une nette diminution de la croissance des tumeurs par injection continue de fortes concentrations de protéines qui inhibent la croissance des cellules endothéliales (cellules formant les capillaires). Avec la thérapie génique, on cherche à faire produire une protéine antiangiogénique sécrétée de façon constante au voisinage de la tumeur ou bien dans la circulation sanguine.

4. Une autre stratégie antitumorale est **l'augmentation de la réponse immune spécifique** contre la tumeur. Ceci peut être obtenu en faisant produire, par transfert de gène, des cytokines « TH_1 » immunostimulantes au voisinage de la tumeur. L'avantage du transfert de gène, par rapport à l'injection de protéines recombinantes qui s'était révélée inefficace, est que la cytokine est produite continûment, ce qui mime la situation physiologique ; de plus, la cytokine est produite **localement**, et on évite ainsi les effets nocifs d'une trop grande concentration sanguine de cytokines immunostimulantes et proinflammatoires (fièvre, cachexie, etc.).

5. Le transfert de gène thérapeutique s'est révélé intéressant pour la **vaccination thérapeutique**. On transfère dans ce cas l'ADN codant pour un antigène spécifique de la tumeur, tel que par exemple, pour un mélanome, le MAGE (melanoma associated antigen). Ceci permet d'augmenter la présentation de ces antigènes par les protéines du MHC I (protéines du complexe majeur d'histocompatibilité présentatrices de soi), et stimule la réaction immunitaire contre la tumeur.

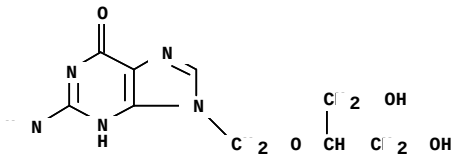
6. Enfin, la dernière stratégie, très originale, de thérapie génique antitumorale porte sur l'utilisation de ***gènes toxiques conditionnels*** associés à l'administration de prodrogues. L'exemple le plus utilisé est celui de la tymidine kinase du virus de l'herpes simplex de type 1 (***HSV1-TK***), mais il en existe plusieurs autres (cytosine déaminase, etc.). Le principe est de détruire les cellules tumorales par l'expression dans ces cellules d'un gène toxique. Ici, le gène HSV1-TK n'est pas toxique en lui-même, mais il **phosphoryle** le ganciclovir administré oralement en ganciclovir monophosphate. Le ganciclovir est un analogue acyclique de la guanosine. Il n'est pas monophosphorylé par la thymidine kinase des mammifères, mais il

l’est par HSV1-TK . Les nucléotides monophosphates sont ensuite convertis en nucléotides di- puis triphosphates par des kinases cellulaires.

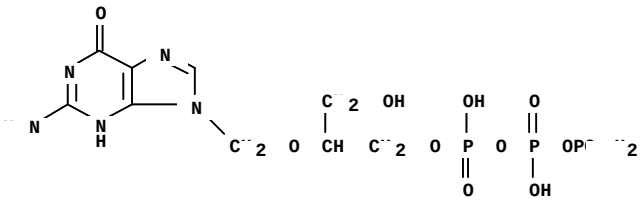
Fig. XII-13 : Prodrogue ganciclovir et agent triphosphorylé terminateur de chaîn

L‘antiherpétique ganciclovir ne peut être phosphorylé que par la tymidine kinase de l’herpes simplex. Le ganciclovir monophosphate est ensuite di – et triphosphorylé par des protéines d’échange cellulaires utilisant l’ATP comme substrat.

Ganciclovir



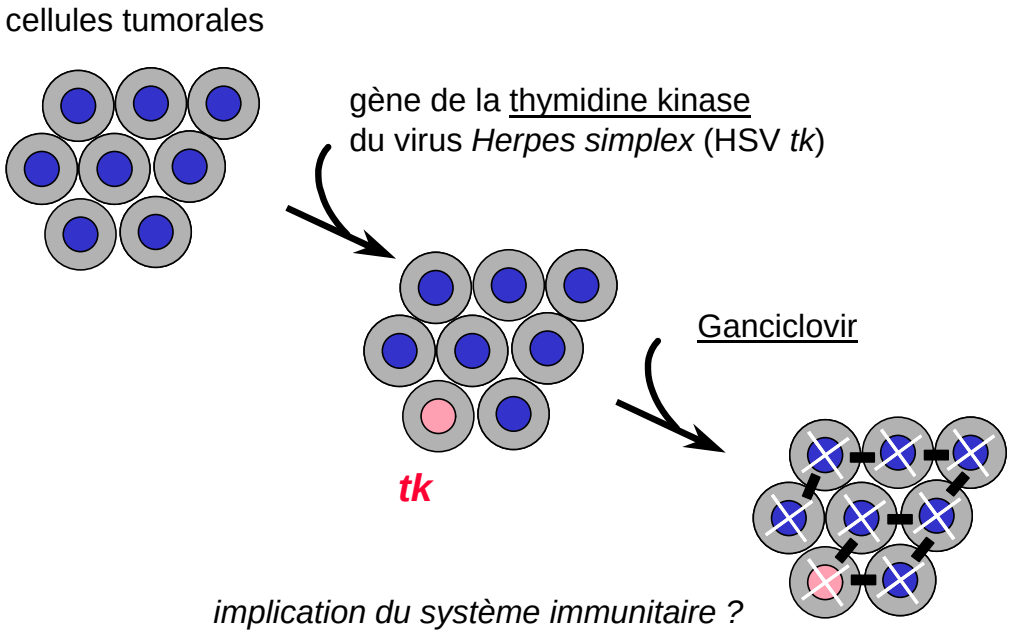
Ganciclovir triphosphate



Le ganciclovir triphosphate est incorporé par les ADN-polymérases dans l’ADN des cellules en réplication. Il joue alors le rôle d’un **terminateur de chaîne**. L’arrêt de la synthèse d’ADN pendant le phase « S » du cycle cellulaire est très mal vécu par les cellules : elles en meurent par un mécanisme apoptotique.

La destruction cellulaire par l’utilisation d’un gène suicide est donc d’une grande **sélectivité** : seules les cellules ayant incorporé le transgène et qui se divisent activement (comme les cellules tumorales) sont affectées. In vitro, l’expression de HSV1-TK augmente la sensibilité des cellules tumorales au ganciclovir de 1000 à 10 000 fois. *In vivo*, le principal problème est que **toutes** les cellules n’incorporent pas le transgène. Mais un effet de voisinage est ici observé : les cellules tumorales sont souvent connectées par des ***jonctions communicantes*** qui permettent la coopération métabolique. Le ganciclovir triphosphate peut ainsi diffuser dans la tumeur et exercer son action cytotoxique sur un très grand nombre de cellules (Fig. XII-14).

Fig. XII-14 : Gène suicide et effet de voisinage



4. Vecteurs d'expression

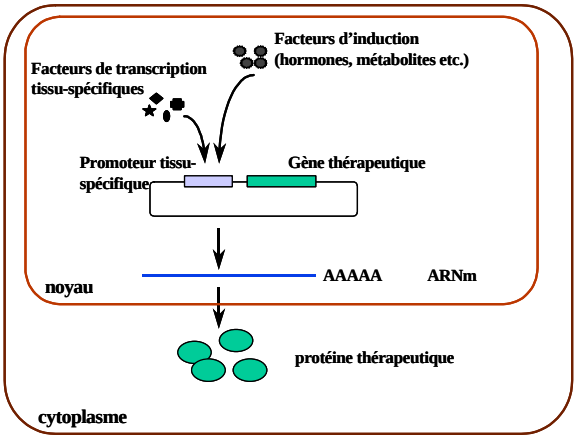
Tous les transgènes utilisés en thérapie génique contiennent non seulement le gène et l'extrémité 3' polyA, mais aussi un promoteur fixant les facteurs de transcription. Ceci constitue la **cassette d'expression** thérapeutique. Les promoteurs sont soit des promoteurs forts viraux, soit des promoteurs humains spécifiques d'un type cellulire différencié. L'utilisation de ces promoteurs spécifiques représente un niveau de contrôle supplémentaire propre à la thérapie génique.

Ceci est illustré, par exemple, dans le cas de la **resténose après dilatation coronaire (ou angioplastie)**. L'angioplastie consiste à gonfler un ballon dans l'artère coronaire (artère qui alimente le cœur) au moyen d'un cathéter introduit depuis la périphérie (la cuisse). En gonflant le ballon, on dilate l'artère coronaire. Il s'agit d'une intervention très fréquente, mais dont l'efficacité est annulée dans 30% des cas par la multiplication rapide **des cellules**

musculaires lisses au niveau de la zone de dilatation. La croissance des cellules musculaires lisses conduit alors rapidement à une resténose. En effet, dans cette zone, les cellules endothéliales recouvrant la paroi des vaisseaux ont été détruites par l'angioplastie, et les cellules musculaires lisses sous-endothéliales sont en contact avec le sérum, qui en stimule la division (effet mitotique du sérum bien connu).

On désire donc dans ce cas administrer un traitement **antiprolifératif** aux cellules musculaires lisses, par exemple par une stratégie de gène suicide HSV1-TK/ganciclovir ou en exprimant une protéine inhibant certaines étapes du cycle cellulaire. Par contre, il est nécessaire que les cellules endothéliales se multiplient le plus rapidement possible, de façon à reconstituer rapidement l'endothélium du vaisseau lésé par la dilatation. On obtient cette sélectivité cellulaire en faisant dépendre l'expression du gène HSV1-TK ***d'un promoteur actif spécifiquement dans les cellules musculaires lisses***, par exemple le promoteur de la myosine (FiG. XII-15). Comme il n'y a pas de coopération métabolique entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, la ganciclovir triphosphate formé dans les cellules musculaires lisses n'exercera pas d'effet antimitotique sur les cellules endothéliales.

Figure XII-15 : Utilisation de promoteurs spécifiques de tissus

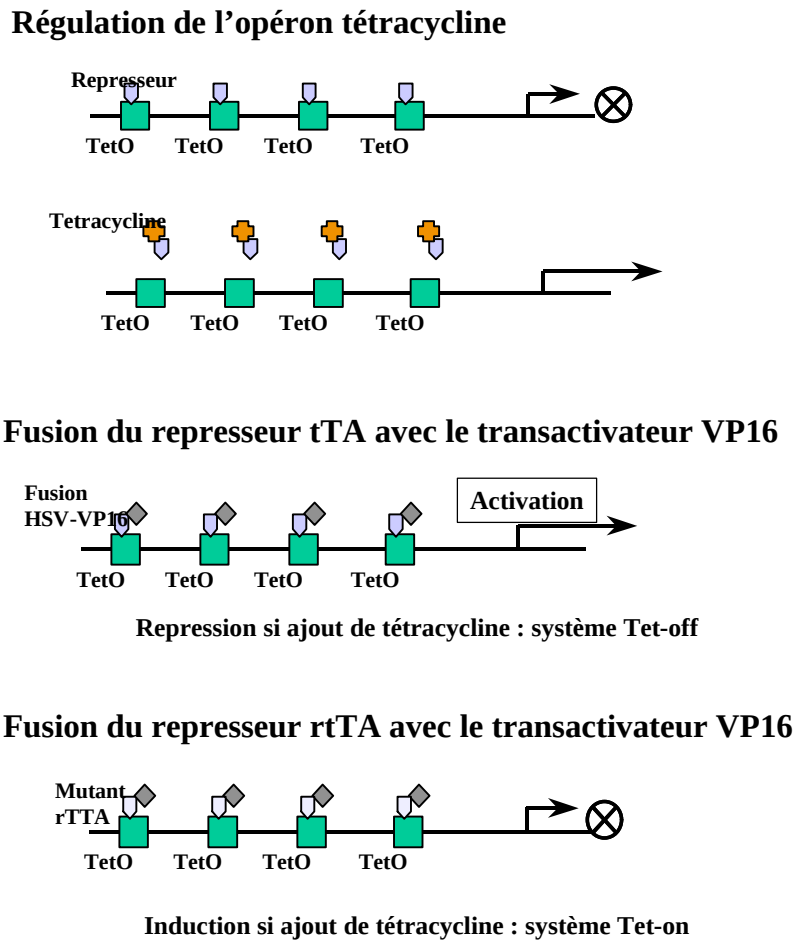


Promoteur	Tissu cellulaire	Gène thérapeutique
PEPCK (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase)	**hépatocytes**	facteur IX (hémophilie)
SPA (Surfactant ProteinA)	**cellules épithéliales** (Poumon)	CFTR (mucoviscidose)
MCK (Muscle Creatinine Kinase)	**Myoblastes**	minidystrophine HSV-tk (resténose)
CEA (CarcinoEmbryonic Antigen)	**cellules tumorales**	HSV-tk

Un autre paramètre déterminant dans certaines situations est le **contrôle temporel** de l'expression des transgènes thérapeutique : il peut être en effet nécessaire d'arrêter ou de moduler la production de la protéine thérapeutique. C'est par exemple le cas lorsque le

transgène produit une cytokine ou une hormone, comme l'érythropoïétine. Pour cela, on utilise des systèmes d'expression inductibles par une molécule chimique qui sera administrée au moment voulu. Le premier des rares systèmes inductibles développés pour la thérapie génique est celui utilisant un **répresseur bactérien contrôlé par la tétracycline** (système Tet-off), ou des dérivés mutés de ce répresseur (système Tet-on).

Figure XII-16 : Systèmes « Tet-off » et « Tet-on » de contrôle de l'expression génétique



La Figure XII-16 donne l'exemple des système dits « Tet off » et « Tet-on ». Le répresseur Tet se fixe sur l'opérateur TetO. Si l'on fusionne la protéine Tet avec un activateur transcriptionnel viral fort, la protéine VP16, on obtient pour le gène situé en aval des opérateurs TetO **une transcription qui sera dépendante de la fixation du répresseur Tet sur TetO**. En présence de tétracycline, le répresseur Tet perd son affinité pour TetO, ce qui conduit à l'arrêt de la transcription : c'est le système Tet-off. Avec le mutant rTTA deu

répresseur Tet, l'équipe d'H. Bujard a obtenu exactement l'inverse : la fixation dee l'activateur transcriptionnel chimérique rTTA-VP16 sur la région promotrice ne s'effectue qu'en présence de tétracycline ! Ce système Tet-on, où l'expression du produit du transgène est induit par l'administration d'un médicament est bien supérieur au système Tet-off sur le plan de la sécurité. Cependant, il présente encore un niveau trop élevé de « fuite », c'est à dire d'expression de base non contrôlée du transgène.

XII-4. Vecteurs d'expression

L'ADN ne rentre pas spontanément dans les cellules. Pour administrer le transgène aux cellules, on recours à plusieurs méthodes que l'on peut classer en deux catégories (Fig. XII-17) :

- **les vecteurs viraux**; dans ce cas, la cassette d'expression thérapeutique est intégrée dans le génome d'un virus recombinant.
- les méthodes **non virales**, qui regroupent **les vecteurs chimiques** d'ADN et **les techniques physiques** d'administration d'ADN ; la cassette d'expression thérapeutique est alors portée par un plasmide produit par une bactérie.

L'amélioration des vecteurs existants constitue un domaine critique, car il est reconnu aujourd'hui que le facteur limitant le développement de la thérapie génique *in vivo* est le manque de vecteurs d'expression génétique et de techniques d'administration suffisamment sures et performantes.

Figure XII-17 : Essais cliniques de thérapie génique

300 protocoles approuvés en 1998

➲ vecteurs

> rétrovirus	60 %
> non viral	20 %
> adénovirus	10 %
> autres virus	10 %

➲ indications

> cancer	68 %
> maladies génétiques (50% mucoviscidose)	17 %
> SIDA	12 %
> autres	3 %

Transfert de gène médié par un virus

Il était naturel de songer aux virus pour transférer du matériel génétique. Un virus est en effet un simple vecteur de son propre génome, qu'il introduit et fait reproduire par les cellules infectées. Les virus ont donc, au cours de l'évolution, développé des stratégies extrêmement performantes pour délivrer leur génome dans le noyau des cellules. De nombreux virus sont utilisés dans des protocoles de thérapie génique, soit au niveau recherche, soit dans le cadre de protocoles cliniques chez l'homme, pour lesquels vecteurs viraux ont été employés à ce jour : **les rétrovirus**, **l'adénovirus**, et **le virus associé à l'adénovirus** (AAV). De grands progrès ont été obtenus récemment dans l'utilisation de lentivirus recombinants tels que HIV : le grand meurtrier sera peut-être un jour converti en un outil thérapeutique !

Quel que soit le virus, on utilise en générale un virus rendu non infectieux par la délétion d'une partie plus ou moins importante de son génome, et l'espace libéré dans le génome viral est avantageusement utilisé pour intégrer la cassette d'expression thérapeutique. Les virus ont en effet une dimension limitée qui ne permet pas d'encapsider de trop grands fragments d'acides nucléiques. Comme un tel virus défectif est **non réplicatif**, on a recours pour le produire à **des lignées cellulaires complémentantes**.

Fig. XII-18. Production de vecteurs rétroviraux

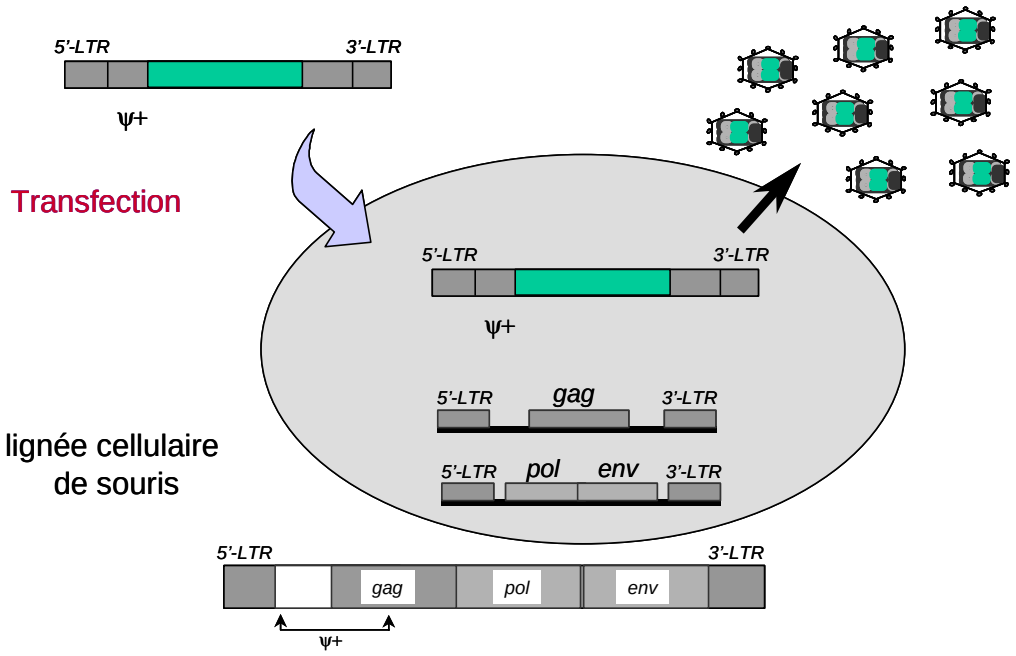
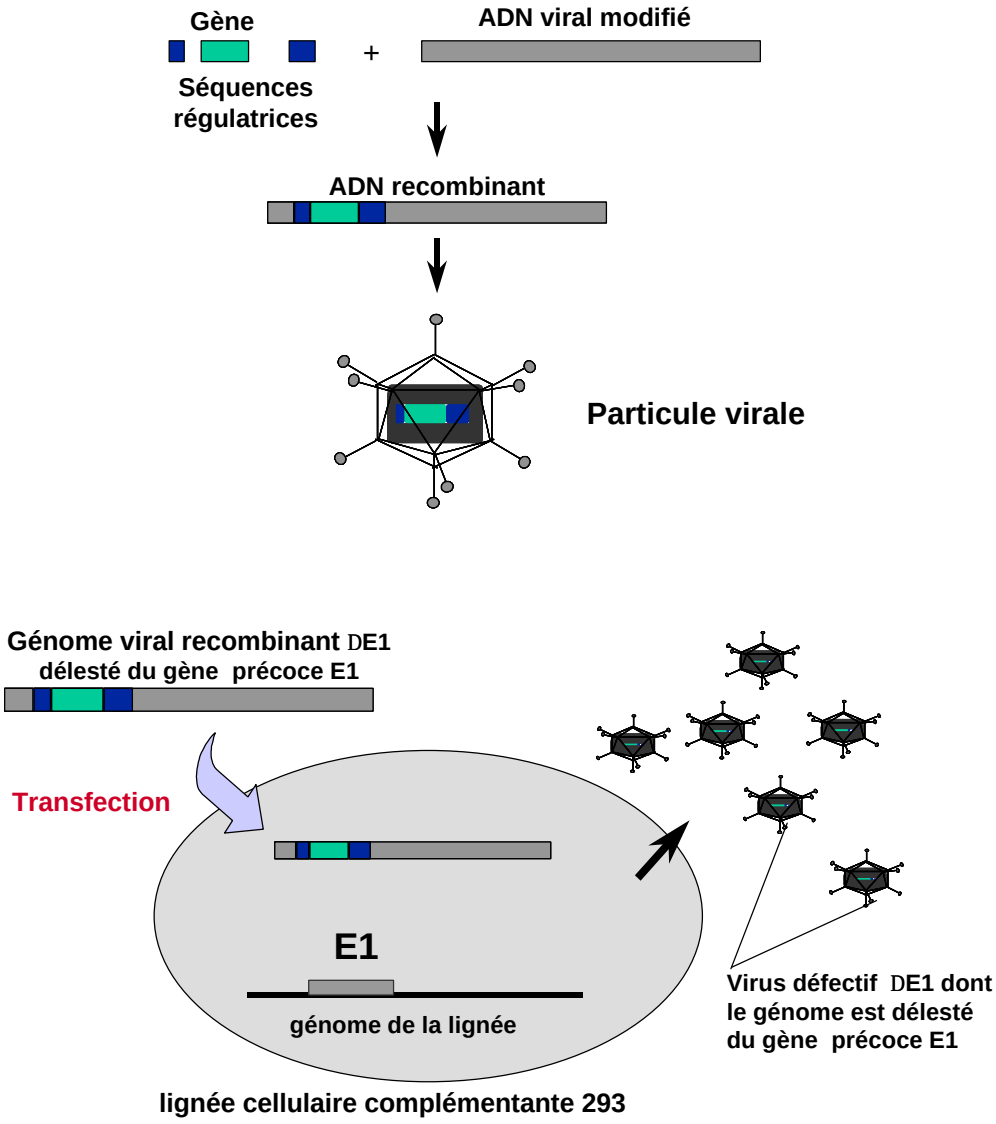


Figure XII-19 : Adénovirus recombinant et sa production en cellule complémentante



Chaque vecteur viral a en quelque sorte sa spécialité :

- Les rétrovirus sont utilisés lorsque l'on cherche une **expression stable des transgènes dans des cellules qui se divisent**. Pour cela, on doit **intégrer** le transgène dans le génome de la cellule hôte, afin qu'il soit répliqué en même temps que les chromosomes de la cellule. Les rétrovirus en général n'infectent

que les cellules en division. Par contre, la sous-classe des lentivirus (HIV) infectent aussi très bien les cellules quiescentes.

- L'adénovirus n'intègre pas son génome dans celui de l'hôte. Il possède une excellente capacité de transfert de gène *in vivo*, en particulier sur les tissus épithéliaux. Il a été utilisé pour des essais de thérapie génique de la mucoviscidose, par transfert de gène de la protéine CFTR dans l'épithélium pulmonaire. Malheureusement, l'expression est de courte durée, et l'adénovirus a sur ces épithélium un effet inflammatoire. L'adénovirus est utilisé actuellement comme vecteur dans plusieurs essais de thérapie génique anticancéreuse (adéno p53, etc.).

- L'AAV est très efficace *in vivo* pour transférer un ADN dans les cellules musculaires. Il est capable d'intégrer son génome dans celui de l'hôte, avec une faible efficacité toutefois.

Méthodes d'administration non virales

Les vecteurs *viraux*, utilisés dans la majorité des essais cliniques, présentent une bonne efficacité de transfert de gène *in vivo*. Leur utilisation est toutefois souvent associée à des problèmes de réponse immunitaire, comme cela a été malheureusement le cas en l'an 2000 dans le protocole clinique de J. Wilson à Philadelphie, qui a conduit au décès du jeune patient Gelsinger. Ce dernier, atteint d'une déficience génétique non létale en enzyme hépatique ornithine transcarbamylase, a été victime d'une réaction immunitaire massive contre les protéines externes du vecteur adénoviral utilisé, adénovirus qui avait été administré à dose élevée par voie entéro-hépatique.

Outre la réponse immunitaire, les vecteurs viraux de thérapie génique présentent le risque de génération de particules virales infectieuses (compétentes pour la réplication) par recombinaison homologue. Ils ont, de plus, une capacité trop limitée pour accueillir des

transgènes de grande taille, comme par exemple l'ADNc de la dystrophine. Enfin, leur production de manière suffisamment pure pour une utilisation en clinique humaine est difficile à maîtriser.

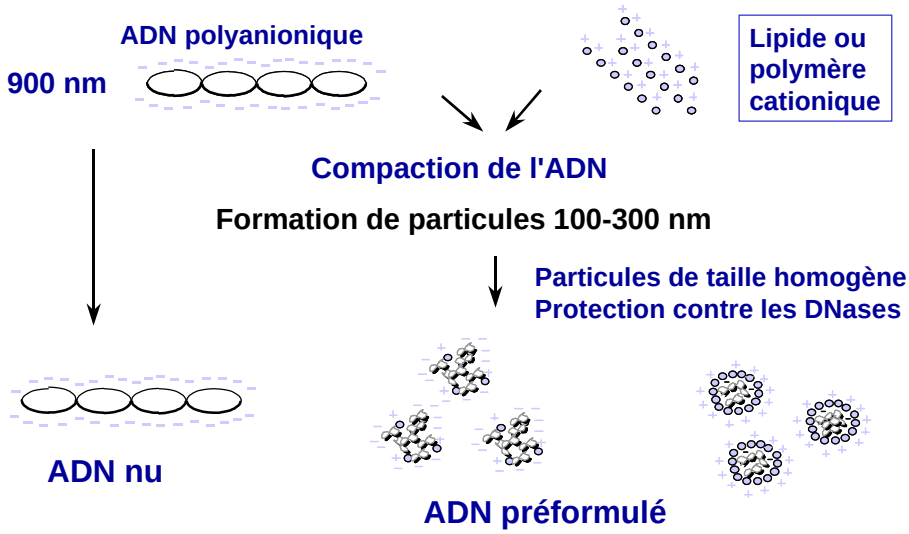
L'ADN thérapeutique non viral utilise des **plasmides bactériens** comme vecteurs d'expression génétique, et des **agents chimiques ou des méthodes physiques** comme vecteurs d'administration de ces plasmides. Les techniques non virales méthode de transfert de gène thérapeutique présentent de nombreux avantages, en particulier le fait que cette approche ne génère pas de réponse immune contre le vecteur, ce qui permet la **réadministration**. De plus, il n'y a pas de risque de recombinaison conduisant à des agents réplicatifs, et la production selon les bonnes pratiques en vue de l'utilisation chez l'homme en est grandement facilitée. Enfin, avec ces techniques non virales, il n'y a pas de limite *théorique* à la taille de l'ADN transfecté. Cependant, mis à part le cas du transfert dans le muscle qui sera présenté plus loin, les méthodes non virales restent actuellement moins efficaces que les méthodes virales *in vivo*.

La thérapie génique non virale implique de maîtriser plusieurs étapes : la conception des plasmides, leur purification, la formulation du gène thérapeutique et de son vecteur, l'administration de l'ADN au patient, l'accès du gène aux cellules cibles, son entrée dans les cellules puis dans leur noyau, et enfin l'expression du produit thérapeutique. Il n'est pas possible dans le cadre de ce cours de détailler tous ces points. Nous n'évoquerons que les principes de base des vecteurs chimiques et d'une technique physique d'administration utilisant les champs électriques.

Vecteurs chimiques d'ADN

Les vecteurs chimiques d'ADN sont des molécules cationiques s'auto-associant avec l'ADN, qui est un polymère polyanionique à cause des charges des phosphates. Les vecteurs chimiques d'ADN les plus utilisés sont soit des polymères cationiques (la polylysine ou encore le polyéthylèneimine, qui semble posséder une propriété de tampon "éponge à proton" intéressante pour l'activité de transfert de gène), soit des lipides cationiques. Polymères et lipides cationiques forment avec l'ADN polyanionique des complexes auto-associatifs, appelés respectivement ***polyplexes*** et ***lipoplexes***.

Figure XII-20 : formation d'un lipoplexe ou d'un polyplexe



Les vecteurs lipidiques de transfert de gène portent une ou plusieurs charges cationiques dans leur partie hydrophile (Fig. XII-21). Dans ce dernier cas, la « tête » cationique est sont généralement de type polyamine. L'exemple de lipide cationique de la figure XII-22 contient une spermine.

Figure XII-21 : Lipide cationique

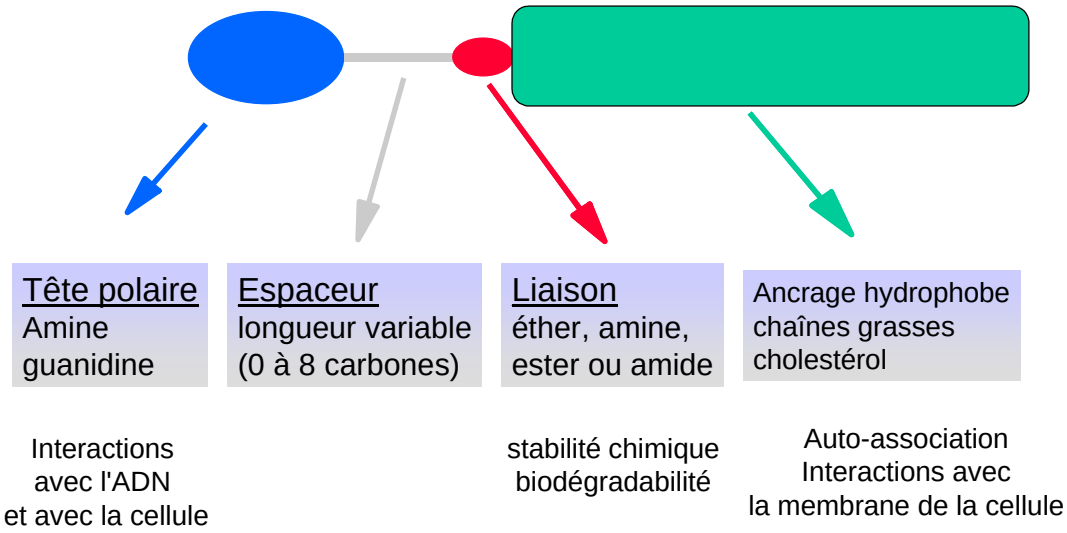
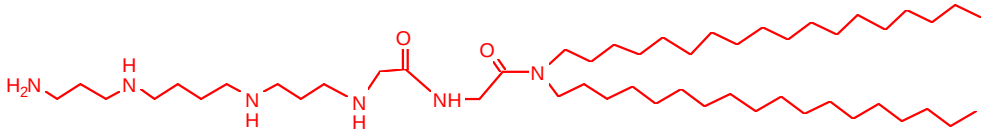


Figure XII-22 : Une lipospermine



Le mécanisme d'internalisation cellulaire de l'ADN repose sur l'interaction électrostatique entre ***la membrane cellulaire anionique*** et les lipoplexes ou polyplexes, qui sont globalement rendus cationiques par l'excès des charges apportées par le vecteur. L'internalisation se fait par endocytose adsoptive, suivie de la sortie de l'endosome.

Figure XII-23 : Internalisation cellulaire d'un lipoplexe ou d'un polyplexe

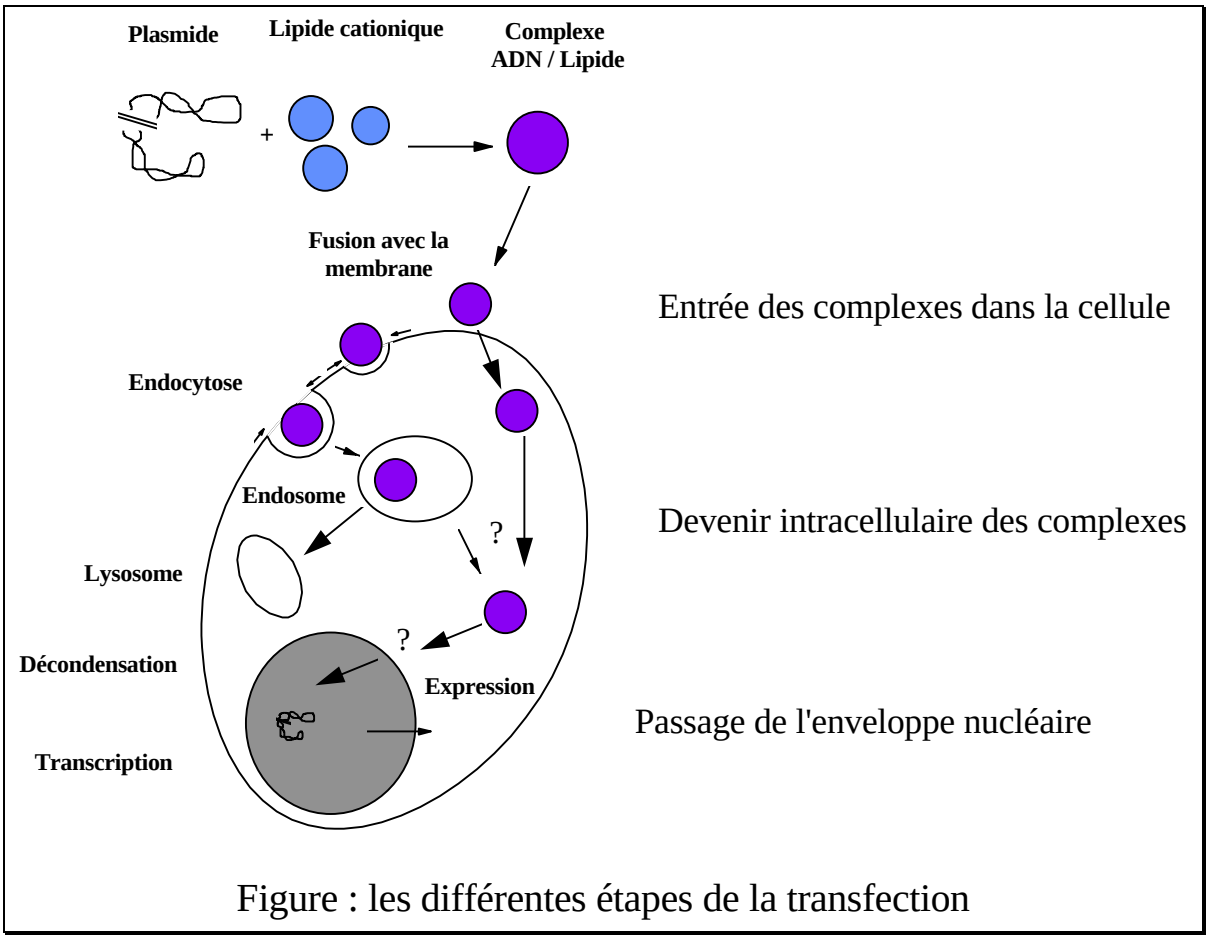


Figure : les différentes étapes de la transfection

Dans le cas d'une injection intraveineuse *in vivo*, on a constaté que les polyplexes ou lipoplexes d'ADN compacté étaient rapidement éliminés de la circulation par **le système réticulo-endothélial** (sorte de « poubelle » constituée de cellules macrophagiques du foie et de la rate, qui élimine les microorganismes étrangers circulants). De plus, les lipoplexes et polyplexes forment des interactions non spécifiques avec les constituants du sang, en particulier l'albumine, qui conduisent à l'inactivation de leur capacité de transfert de gène. On peut partiellement circonvenir ces problèmes en adjoignant aux polyplexes et lipoplexes une couche externe formée de chaînes de polyoxyéthylène (polyéthylèneglycol, PEG). Dans le cas des lipoplexes, ces chaînes de PEG sont ancrées dans la particule par une partie lipidique hydrophobe. Ces chaînes de polyoxyéthylène ont, en outre, un rôle de stabilisateur collo dal qui prévient la précipitation des lipoplexes. Enfin, il est possible de greffer chimiquement, sur les vecteurs eux-mêmes ou à l'extrémité des chaînes de polyoxyéthylène, des molécules assurant le ciblage des lipoplexes vers les récepteurs cellulaires appropriés.

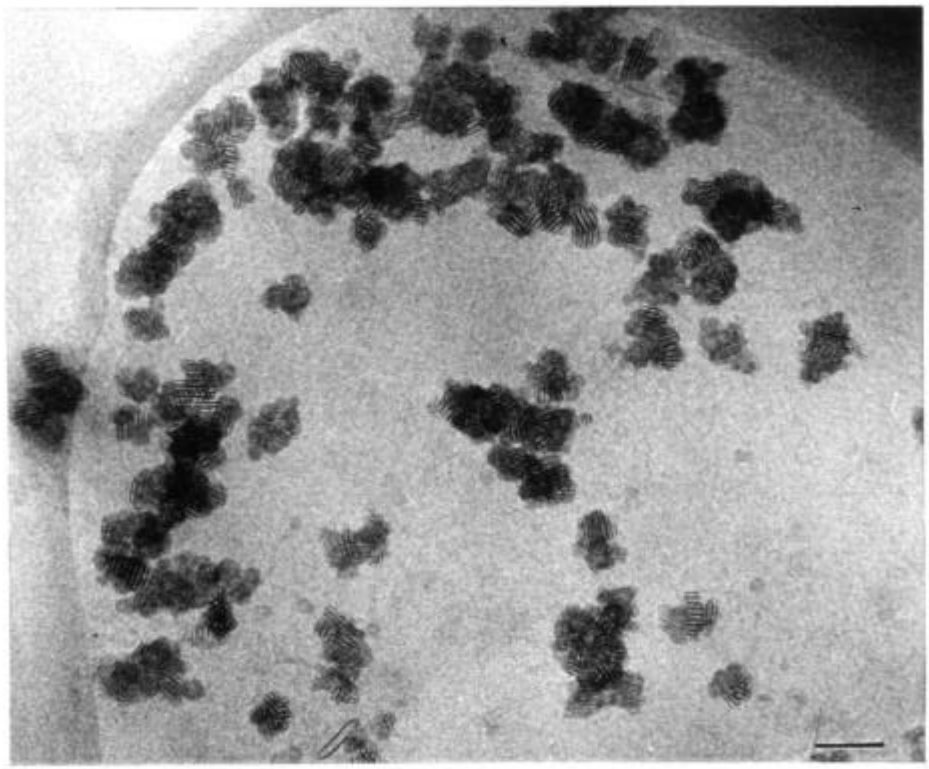
Physico-chimie et étude structurale des lipoplexes

In vitro, les performances des lipoplexes ou polyplexes égalent ou même dépassent celles des certains vecteurs viraux. Cependant, ceci n'est pas le cas *in vivo*, où la relativement faible efficacité relative de transfert de gène des vecteurs synthétiques, ainsi que le manque de corrélation entre les études de transfection *in vitro* et *in vivo*, ont montré l'urgence d'acquérir une meilleure compréhension de l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et cellulaires constituant le transfert de gène. Un enjeu de cette discipline est donc la maîtrise de la **physico-chimie de la formation et de l'assemblage des complexes ADN/vecteur**, de façon à obtenir une taille réduite nécessaire pour assurer une bonne biodisponibilité et accessibilité au tissu cible.

Les méthodes d'analyse physico-chimique des particules sont celles de la science des collo des. Elles sont principalement basées sur les techniques de diffusion quasi-élastique de la lumière, de microscopie électronique, de dichro sme circulaire, ou de diffusion des rayons X et des neutrons. Peu de données structurales sont aujourd'hui disponibles. Les lipoplexes ou polyplexes ont de 40 à 150 nm de diamètre. Selon la nature du vecteur cationique, l'ADN peut être recouvert d'une double couche lipidique en une structure allongée tubulaire, ou participer à la formation de particules sphériques où des molécules

d’ADN sont intercalées entre des bicouches lipidiques avec une périodicité de 6 à 8 nm (FigXII-24). L’addition d’ADN à une solution de liposomes ou de micelles de lipides cationiques semble, de façon relativement générale, provoquer une réorganisation des lipides en **une structure multilamellaire**. L’ADN y est compacté et protégé des forces mécaniques ou biologiques telles que l’action des DNases extracellulaires (les DNases sont des enzymes -protéines - qui coupent l’ADN).

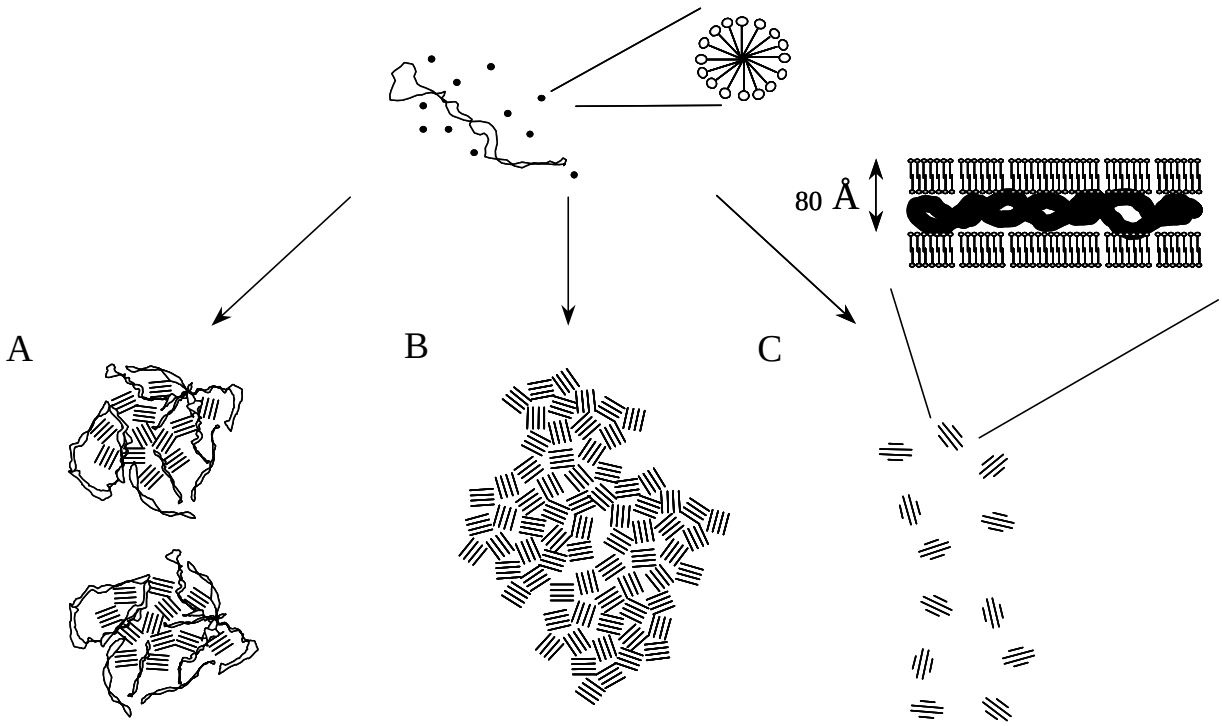
Figure XII–24 : Lipoplexes formés entre de l’ADN plasmidique et la lipospermine de la figure 22



Les quantités respectives d'ADN et de vecteur cationique, ainsi que la nature du solvant, le mode opératoire, ou encore le rapport de charge lipopolyamine/ADN (+/-), influent sur la structure des particules obtenues et sur l'efficacité de transfection.

Figure XII-25 : Structure des lipoplexes

La structure dépend du rapport des charges cationiques apportées par le vecteur sur les charges anioniques de l'ADN :
A : rapport < 1 .
B : rapport au voisinage de 1, la neutralité des complexes induit leur agrégation.
C : rapport supérieur à 1, de petites particules globalement cationiques sont formées.



XII-6. ADN plasmidique « nu » *in vivo* et méthodes physiques de transfert de gène.

Une découverte très surprenante a été a été décrite en 1991. Le transfert d'un gène dans le muscle squelettique par injection d'un simple **plasmide "nu"**, en l'absence de tout vecteur chimique, conduit à une expression stable pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois dans certains exemples. Mieux, lorsque l'on ajoute des vecteurs chimiques, le transfert de gène est diminué. Il s'agit ici d'une particularité du tissu squelettique.

Cette possibilité d'observer une expression après la simple injection de plasmide est étudiée actuellement pour la **néoangiogénèse thérapeutique**, c'est à dire pour la formation de nouveaux vaisseaux et capillaires dans les membres périphériques inférieurs ischémiés. Pour cela, on transfère le gène d'un facteur de croissance tel que le VEGF (vascular endothelial growth factor), ou le FGF (fibroblast growth factor), qui induit la multiplication des cellules endothéliales du muscle. Il s'agit actuellement de la seule alternative thérapeutique à l'amputation pour plusieurs dizaines de milliers de malades.

Figure XII-26 : Angiogénèse thérapeutique

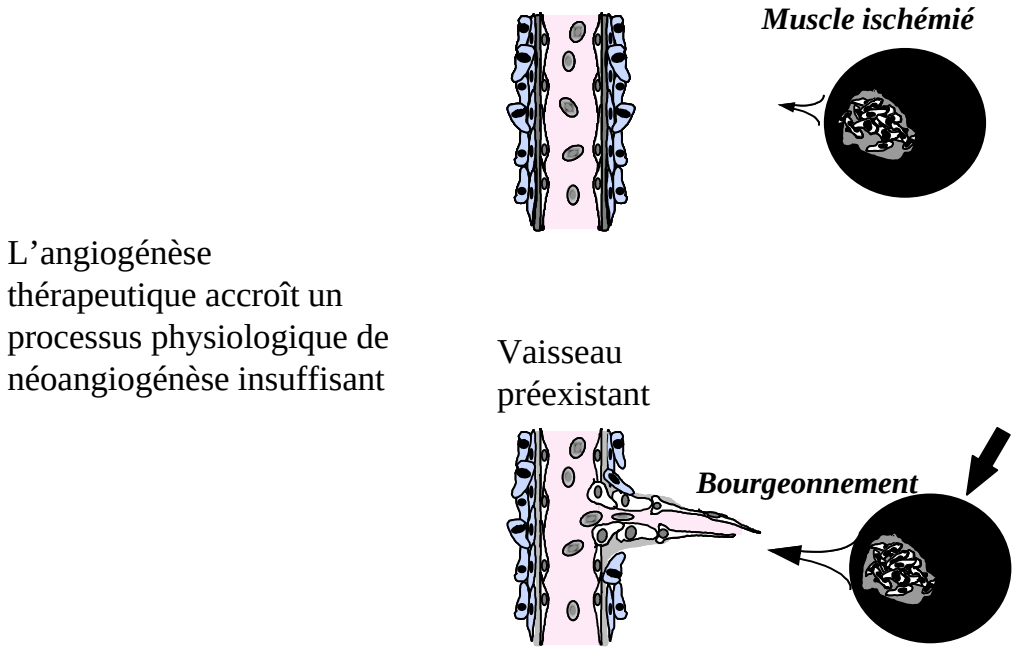
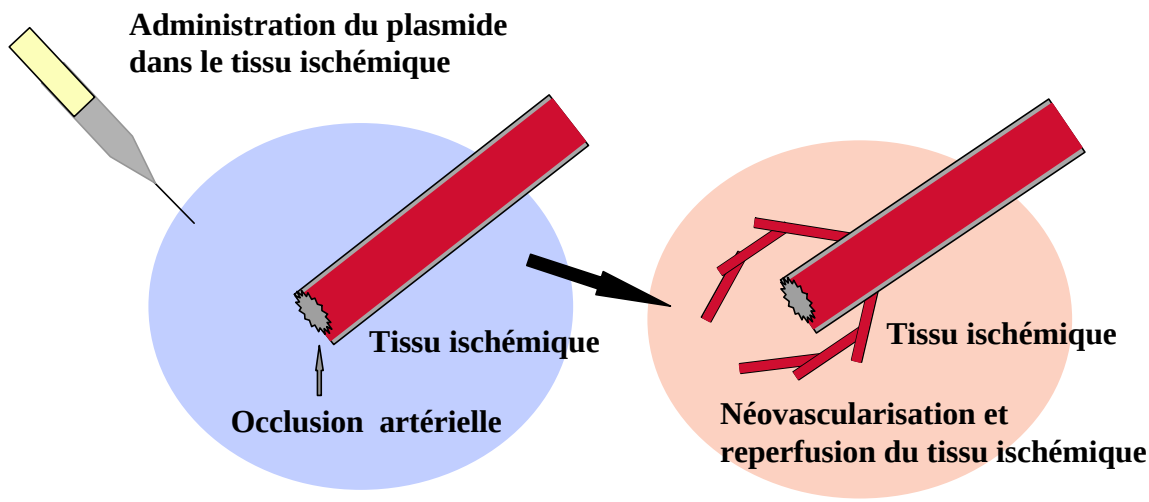


Figure XII-27 : Mise en œuvre de l'angiogénèse thérapeutique



Bien qu'intéressante pour certaines applications, le technologie de l'ADN plasmidique « nu » doit faire face à deux limitations majeures. En premier lieu, un niveau d'expression beaucoup trop faible pour le traitement de pathologies telles que l'hémophilie ou les dystrophies. En second lieu, un très fort niveau de variabilité inter-individuelle, qui peut être de 1000 à 10 000.

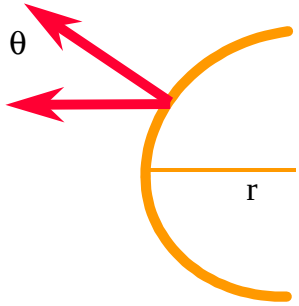
Ces verrous technologiques ont pu être surmontés grâce à une nouvelle technique physique d'administration : **l'électrotransfert**. L'utilisation de champs électriques optimisés pour le transfert d'ADN dans le tissu musculaire conduit à un niveau de transfert d'ADN exceptionnellement efficace. Le procédé consiste à injecter de l'ADN plasmidique dans le muscle squelettique, puis à appliquer sous anesthésie à ce muscle quelques impulsions électriques de 100 à 200 V/cm, de quelques millisecondes chacune.

Le mécanisme de cette transfection repose sur deux phénomènes. D'une part, les impulsions électriques perméabilisent transitoirement les cellules du muscle. D'autre part, le champ électrique provoque la **migration électrophorétique** de l'ADN à travers la membrane de la cellule électroperméabilisée. De ce double effet résulte une très grande efficacité de transfert de gène (Figures XII-28 à XII-30).

Figure XII-28 : Electroperméabilisation cellulaire par un champ électrique

Le champ électrique E_{ext} induit
un potentiel transmembranaire
à travers la membrane plasmique des cellules:

$$\Delta V_m = E_{ext}\ 1.5\ r \cos\theta$$



Si : $\Delta V_m > 0.2 - 0.3$ V :

⇒ désorganisation des membranes biologiques
⇒ perméabilisation

Figure XII-29 : Electrotransfert d'un plasmide codant pour la b-galactosidase

A et C, ADN nu ; B et D : électrotransfert

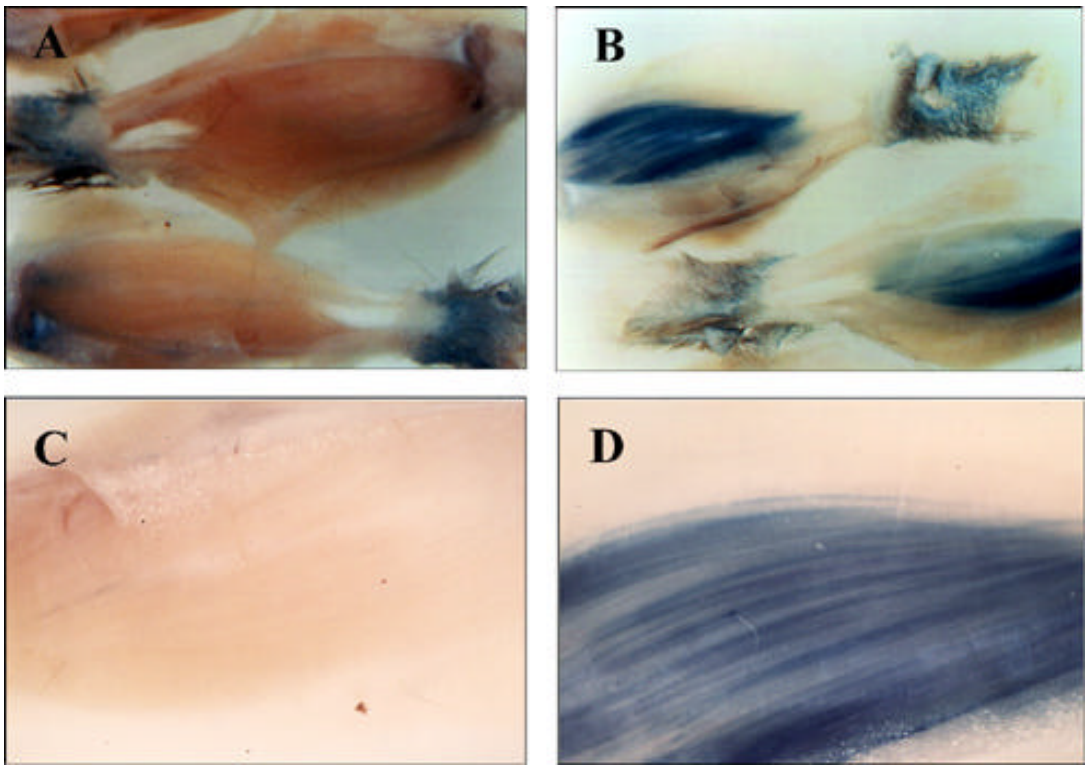
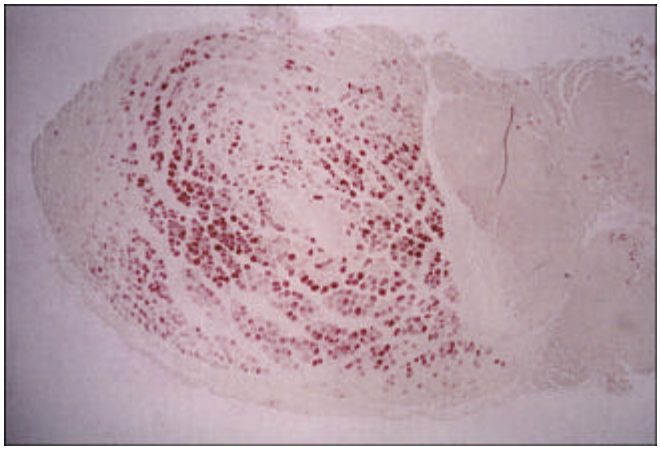
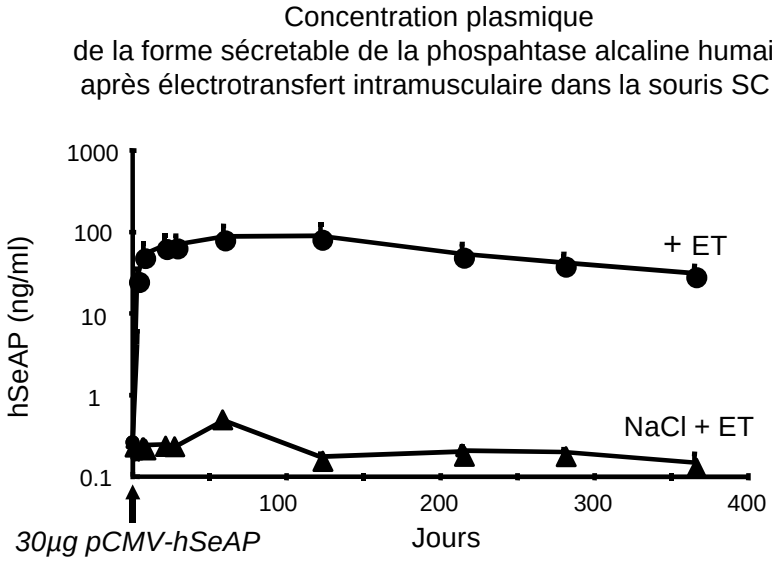


Figure XII-30 : Révélation immunohistochimique de l'expression du FGF acide après électrotransfert dans le muscle tibial cranial de souris d'un plasmide codant pour le FGF sous promoteur hCMV du cytomégalovirus humain



Comme indiqué auparavant, un intérêt potentiel majeur du transfert de gène intramusculaire est l'utilisation du muscle squelettique comme glande endocrine pour la sécrétion de protéines thérapeutiques circulantes. Après électrotransfert, les myofibres sont capables de sécréter, à un niveau élevé, une protéine **pendant au moins 18 mois, et ceci après une seule injection de plasmide.**

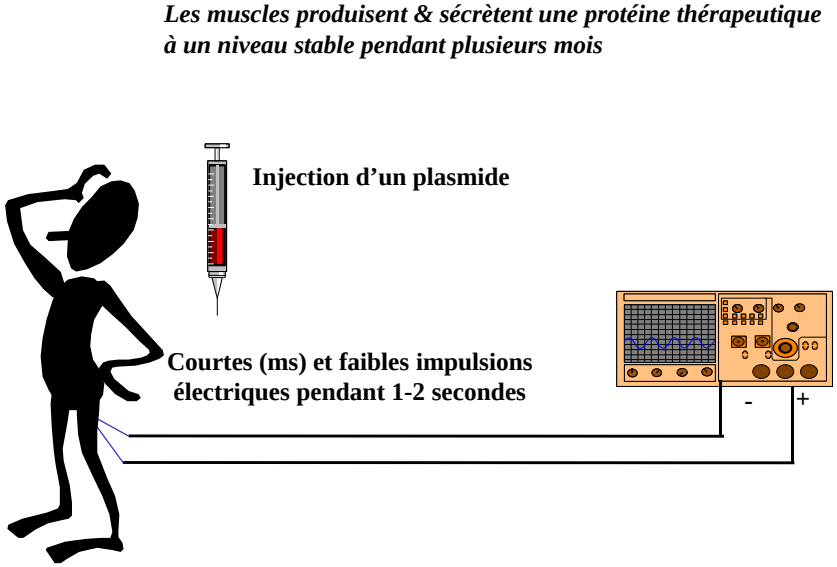
Figure XII-31 : Sécrétion après électrotransfert de son gène d'une protéine « rapporteur », la phopshatase alacaline placentaire



La décroissance de 30% de la concentration plasmatique peut être attribuée à l'augmentation de taille et de volume sanguin des animaux pendant la durée de l'expérience.

L’électrotransfert intramusculaire pourrait s'appliquer au traitement des pathologies musculaires et neuromusculaires, ou encore aux traitements qui nécessitent une protéine thérapeutique véhiculée par la circulation sanguine, comme par exemple de nombreux déficits métaboliques ou processus inflammatoires et/ou autoimmuns. Les applications de l’électrotransfert intramusculaire au traitement des pathologies inflammatoires et cardiovasculaires (arthéroslérose et ischémie), de la β-thalassémie, de l’hémophilie, des myopathies, des troubles de croissance, ainsi que pour la vaccination ont fait l’objet d’études sur modèle animal. Mentionnons, en conclusion de cette partie, que la méthode d’électrotransfert a pu être étendue à d’autres systèmes, comme dans les tumeurs, en utilisant des conditions différentes de celles du muscle.

Figure XII-32 : L’électrotransfert en pratique



XII-7. Thérapie *ex vivo* de l'immunodéficience sévère liée au chromosome X: la première « success story » de la thérapie génique

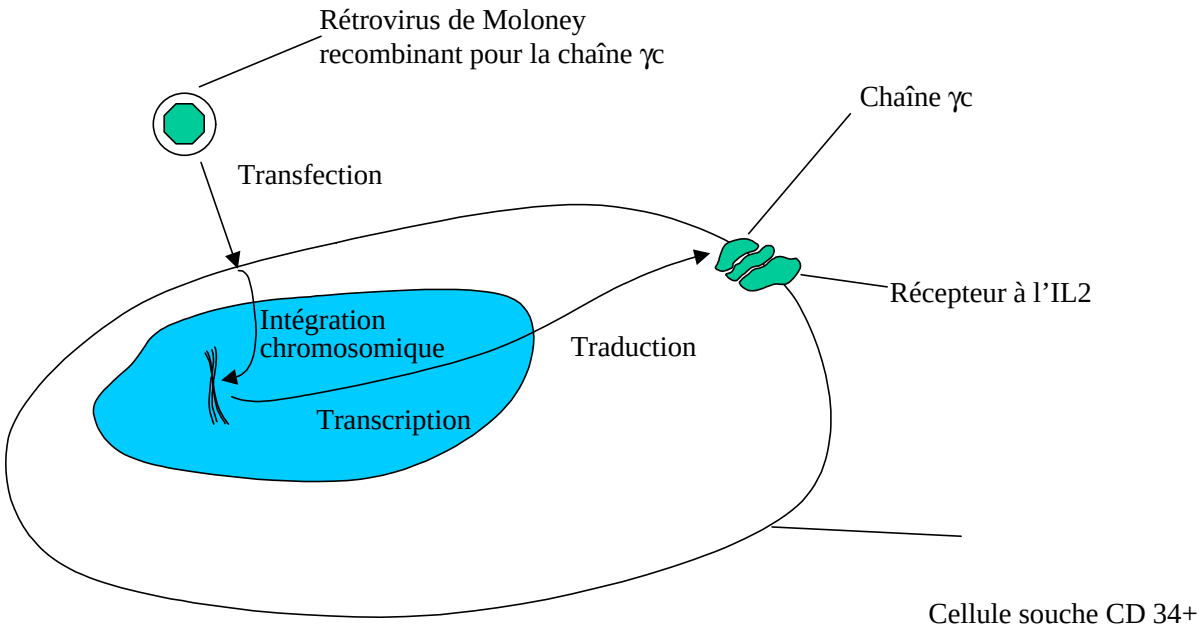
Les travaux de l'équipe d'Alain Fischer à l'Hôpital Necker publiés en 2000 dans la revue *Science* ont constitué une première réussite historique de la thérapie génique. Ils portent sur le traitement de **l'immunodéficience sévère combinée liée au chromosome X** (**DICS-X1**, déficience immunitaire combinée sévère liée à l'X, SCID-X1). Le syndrome de cette maladie est l'absence de lymphocytes T et NK (natural killer). Fait remarquable, la déficience en plusieurs populations cellulaires est ici causée par des mutations « non sens » de la sous-unité γc du récepteur à diverses cytokines : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et Il-15. Ces récepteurs possèdent plusieurs sous-unités spécifiques de chaque interleukine, mais ils ont tous en commun la sous-unité γc. Comme ces cytokines induisent la différenciation des cellules issues de cellules souches hématopoï étique vers les lignées lymphocytaires T et NK, la non-fonctionnalité des récepteurs à ces cytokines entraîne l'arrêt de la différenciation et l'absence des populations lymphocytaires concernées.

Cela provoque une maladie létale liée à **l'absence de réponse immune cellulaire** (bébé bulles), pathologie qui ne peut pas être soignée actuellement, sauf par greffe de moelle osseuse compatible. La stratégie de thérapie génique employée par le groupe d'A. Fischer portait sur la transduction stable de cellules souches. Le protocole est décrit dans la figure XII- 33. Pour le transfert de gène ex vivo sur des cellules de la moelle osseuse des patients, l'équipe d'A. Fischer a utilisé un rétrovirus de « Moloney ». Afin d'améliorer l'efficacité de transfert de gène sur les cellules souches réellement pluripotentes, on les met en cycle une brève période *in vitro* en utilisant un « cocktail » de cytokines.

Malgré cette astuce, le rendement de transduction des **cellules réellement pluripotentes**, pouvant conduire à une différenciation en lignées lymphocytaires T et NK, reste très faible. Toute l'approche était donc basée sur le raisonnement que, par transfert du gène γc aux progéniteurs lymphocytaires appelés cellules CD34+, on conférait un avantage sélectif à la minorité des cellules transduites : en effet, elles seules prolifèrent sous stimulation par les cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et Il-15, car elles seules possèdent un récepteur compétent. L'espoir était que les quelques progéniteurs lymphocytaires transduits allaient être capable de coloniser l'ensemble de la moelle osseuse, ce qui fut effectivement observé. Sans

autre traitement, des enfants DICS-X1 ont quitté leur bulle quelques mois après une seule intervention de thérapie génique ex-vivo !

Figure XII-33 : Thérapie génique ex vivo de la DICS-X1



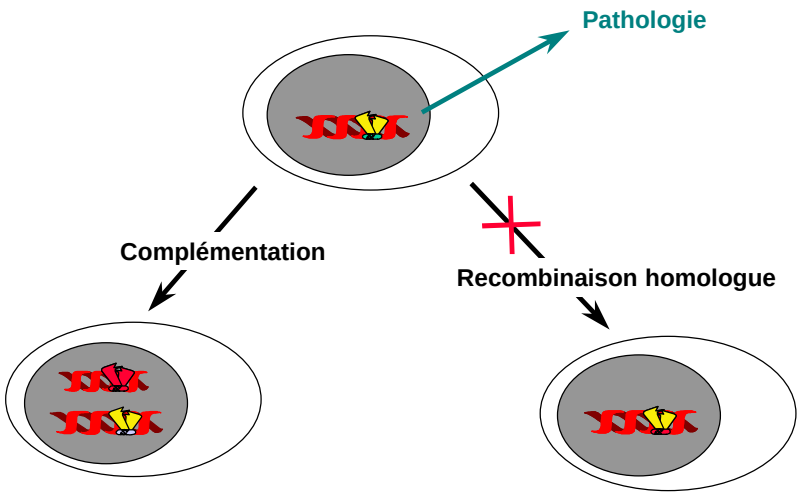
XII- 8 Peut-on réparer l'ADN ?

Jusqu'à présent, toutes les approches présentées dans ce chapitre portaient sur le concept de complémentation : on obtient un effet thérapeutique en administrant un ODN ou un ADN qui agissent dans le cytosol, le noyau extra-chromatinien, ou même en s'intégrant dans la chromatine de façon aléatoire lorsqu'un vecteur rétroviral est utilisé.

Lorsqu'une pathologie est liée à la déficience d'un gène à cause d'une mutation ou d'une délétion, l'idéal serait de réparer *in situ* l'ADN défectif. En effet, en replaçant un gène sain exactement dans la même location chromosomique que le gène endogène, on assure **une régulation physiologique optimale du gène** : la protéine n'est exprimée que là où elle doit l'être, et au moment opportun du point de vue physiologique, car le gène est correctement positionné par rapport à l'ensemble des éléments de contrôle de l'expression génétique, même ceux situés à grande distance dans le génome comme les LCR (locus control region).

On sait, dans certains organismes comme la levure, assez bien remplacer un gène ciblé par un autre. La technologie de **recombinaison homologue** utilisée repose sur la sélection d'un événement très rare. La recombinaison homologue n'est pas encore utilisable chez l'homme. De plus, elle ne pourrait s'appliquer qu'à des cellules en division rapide dont on pourrait sélectionner une sous-population très minoritaire. A cause de cela, les protocoles de thérapie génique présentés jusqu'ici reposent sur le principe de la complémentation.

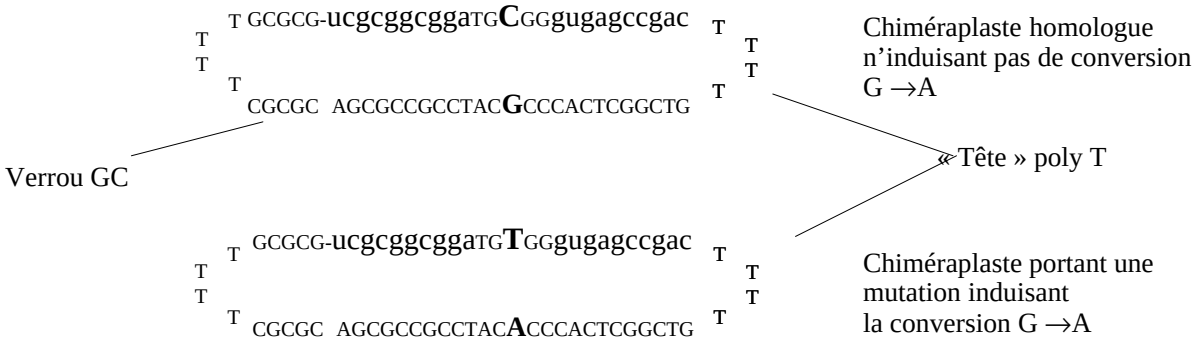
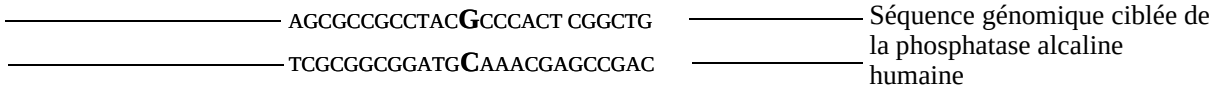
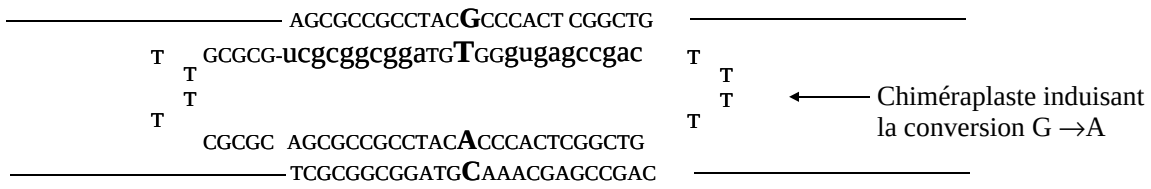
Figure XII-34 : Complémentation et réparation



Ici intervient la revanche de oligonucléotides de synthèse, qui semblent avoir fait une percée dans le domaine de la **réparation des mutations ponctuelles de l'ADN**. En 1996 a paru, en effet, un article de l'équipe de E.B. Kmiec qui a enthousiasmé certains et laissé de nombreux autres incrédules : il s'agissait de l'utilisation d'oligonucléotides chimériques ADN/ARN capables d'induire une mutation ponctuelle ciblée sur de l'ADN. La démonstration en a d'abord été faite sur des plasmides (donc extra-chromosomiques), puis plus tard sur le chromosome. Les mutations induites ont pu être observées aussi bien sur des gènes en transcription active que silencieux.

Le principe en est illustré sur la figure XII-35. L'agent est une chimère comportant une partie ARN, ce qui permet une hybridation plus forte avec l'ADN. La partie ARN est méthylée sur l'hydroxyle en 2' pour le protéger des nucléases. Les fragments ARN entourent un court fragment d'ADN contenant la mutation ponctuelle que l'on veut introduire. **L'invasion de l'ADN par le chiméraplaste conduit à l'apparition de misappareillements ADN/ADN.** Ceux-ci sont réparés par des enzymes cellulaires spécialisés dans cette fonction. On pense d'ailleurs que la proximité des ARN de la molécule chimérique appelée **« chiméraplaste »**, en mimant une situation rencontrée pendant la réplication, favorise la correction des misappareillements. A cette occasion, dans 50% des cas, c'est l'ADN chromosomique qui est modifié pour rétablir un appareillement de Watson-Crick avec la chimère. Après élimination naturelle de la chimère, le second brin sur l'ADN chromosomique, qui est maintenant en misappareillement, est lui aussi corrigé par le même mécanisme. Au total, on a 25% de chances d'assurer une mutation ponctuelle stable ciblée sur un gène !

On devine le potentiel extraordinaire de cet outil pour la correction des maladies génétiques liées à une mutation ponctuelle, comme les différentes hémophilies, la β-thalassémie ou l'anémie falciforme. Cependant, il faut être prudent. Même si des résultats intéressants ont été publiés sur modèle animal, beaucoup de travail reste à accomplir avant d'introduire ce concept en clinique.

Figure XII-35 : Le principe des chiméraplastes

Ici, un chiméraplaste est conçu de manière à induire une mutation ciblée G ® A sur le *nucléotide 935 du gène de la phosphatase alkaline*