

2^{eme} Partie :

- **Thérapie génique et cellulaire (M1 Génétique).**
- **Génie cellulaire et moléculaire (M1 Pharmaco-toxicologie).**

I- Modalités d'administration de la thérapie génique.

II- Vecteurs viraux

I-Modalités d'administration de la thérapie génique

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.

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 01 présente le concept de thérapie génique *in vivo* et *ex vivo* :

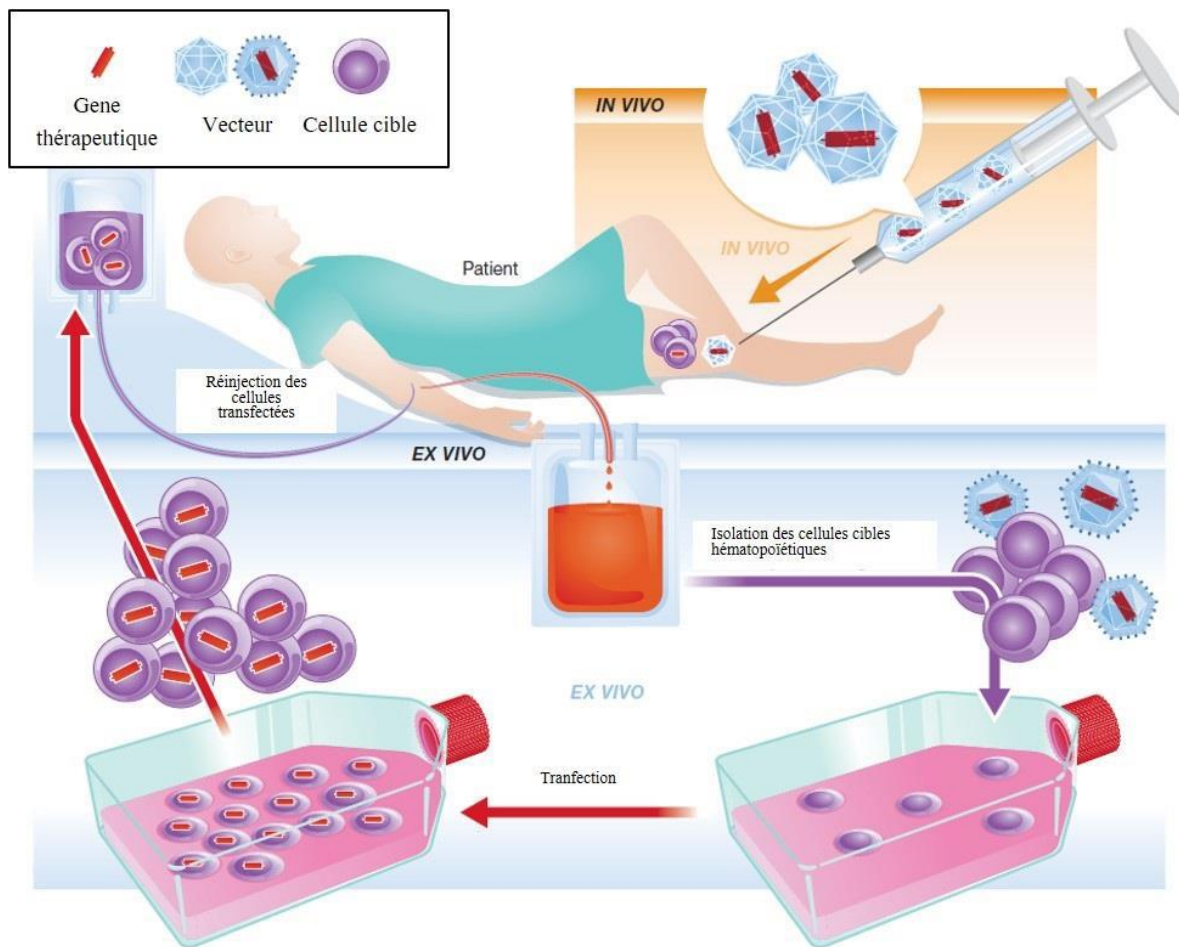


Figure 01 : Concept de thérapie génique *in vivo* et *ex vivo* d'après KAUFMANN *et al.* (2013).

II. Les vecteurs

Un vecteur est une structure permettant le transport, la pénétration du transgène dans les cellules cibles, son expression et son action thérapeutique.

Le vecteur idéal a plusieurs propriétés :

- Culture/production facile et de faible coût,
- Faible immunogénicité,
- Non cytotoxique ou pathogène,
- Possibilité d'insérer une séquence d'ADN relativement longue,

- Protection de la séquence insérée contre les nucléases,
- Capacité d'infection des cellules quiescentes comme en division,
- Ciblage des cellules à transfecter possible,
- Ciblage du site d'insertion ou insertion en un site non mutagène,
- Expression à long terme du transgène chez l'hôte.

A l'heure actuelle, on peut classer les vecteurs en deux types : les vecteurs viraux, les vecteurs non viraux.

1. Les vecteurs viraux

Les virus sont naturellement capables de pénétrer dans les cellules et d'y injecter leur propre génome afin de se répliquer. En réussissant à supprimer les gènes responsables de la pathogénicité des virus sans modifier leurs capacités de pénétration, ces derniers sont devenus des vecteurs de choix pour le transport et la livraison des gènes en thérapie génique. Le principal risque de l'utilisation de virus en tant que vecteurs est leur pathogénicité résiduelle pour l'hôte, malgré les délétions des gènes à effet pathogène, et le risque qu'ils le redeviennent par mutation. Enfin, le principal défaut des virus est leur immunogénicité.

De nombreux virus sont utilisés en thérapie génique (Adénovirus, Lentivirus, Adeno-Associated Virus ou AAV, Herpesvirus, ...) et chaque famille de virus a ses avantages et ses inconvénients. Nous allons prendre ici quelques exemples de virus utilisés en thérapie génique.

a. Les Adénovirus

Les adénovirus sont des virus nus à ADN double brin. Leurs caractéristiques sont :

- Taille des virions entre 80 et 120nm de diamètre,
- Capside icosaédrique,
- Génome linéaire et long de 26 à 44 kb.

Il existe plus de cent sérotypes découverts à ce jour dont 51 infectant l'Homme.

Les adénovirus figurent parmi les vecteurs les plus utilisés en thérapie génique et le sérotype 5 (HAd5) est le plus étudié.

Les adénovirus s'attachent aux cellules via un récepteur appelé CAR (pour Coxsackievirus and Adenovirus Receptor). La protéine virale VI permet l'échappement de l'endosome. Les dynéines cytoplasmiques permettent le transport de la capside le long des microtubules jusqu'aux pores nucléaires où la capside est désassemblée via l'interaction avec différentes protéines pour libérer le matériel génétique dans le noyau sous forme d'épisome (Figure 02).

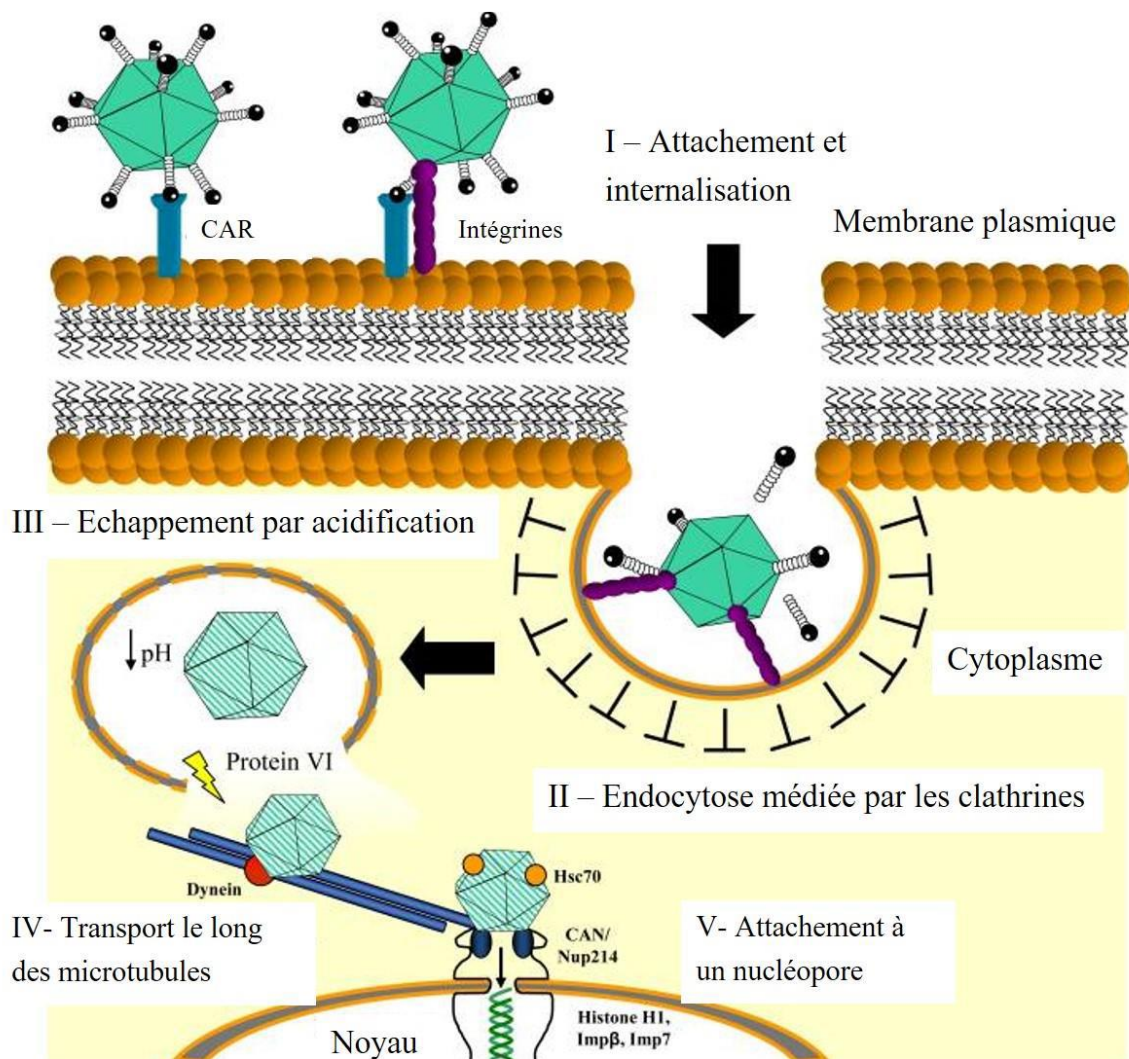


Figure 02 : Mode de pénétration de l'adénovirus HAd5 d'après COUGHLAN *et al.* (2010)

Les adénovirus sont capables d'infecter les cellules en division comme les cellules quiescentes, mais ils n'intègrent pas leur ADN dans le génome de la cellule cible. Cela permet d'éviter les mutations par intégration, mais empêche une expression à long terme du transgène

pour lequel on observe un pic d'expression en 1 à 7 jours puis un rapide déclin en 2 à 4 semaines post-infection.

La première génération de vecteurs a montré une capacité à transfecter de nombreux tissus (muscles, cerveau, pancréas, rein, ...) lors d'une injection directe du vecteur dans le tissu cible alors que seulement le foie et la rate étaient transfectés lors d'injection intraveineuse. Cela a été imputé à la réaction immunitaire mise en place au contact du vecteur. Les vecteurs de première génération étaient capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 8kb.

Des adénovirus vides ou « gutless » ont été créés afin de résoudre ce problème. Ils ne comportent plus d'ADN viral sauf les quelques séquences strictement nécessaires à la réplication du génome. Ces adénovirus sont produits en présence de cellules transcomplémentantes ou cellules « helpes » qui leur procurent les protéines virales nécessaires à la construction des virions. Ces virus sont capables de transporter des transgènes de plus grande taille (jusqu'à 38kb) et l'expression du transgène se fait à plus longue échéance (une étude a montré une expression pendant plus de 2 ans dans le foie de babouins).

De nombreuses études sont réalisées afin de moduler le tropisme des adénovirus via l'identification des récepteurs cellulaires et viraux impliqués dans la pénétration cellulaire et dans la réponse immunitaire. En particulier, l'utilisation des adénovirus en thérapie génique anticancéreuse est compliquée par le fait que la plupart des cellules cancéreuses n'expriment pas le récepteur CAR. Ces recherches sont donc essentielles pour pouvoir utiliser les adénovirus comme vecteurs dans le traitement des maladies acquises.

b. Les Adeno-Associated virus

Les Adeno-Associated Virus (ou AAV) sont des virus incapables de se répliquer sans un virus « helper » tel que les adénovirus, les herpesvirus, ... Ce sont de petits virus (18-26 nm) nus à ADN simple brin. A l'état naturel, ils sont capables de s'intégrer dans le génome humain, préférentiellement dans un site spécifique sur le chromosome 19 grâce à des protéines virales codées par leur gène *REP*. Le taux d'intégration spontanée est faible et quasiment nul quand le gène *REP* est supprimé. Dans ce cas, l'intégration perd aussi sa spécificité de site. Leur matériel se comporte la plupart du temps comme un épisome et reste en dehors du génome de la cellule infectée. Les vecteurs créés à partir d'AAV sont capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 4,8kb.

Il a été démontré que l'expression du transgène était longue (jusqu'à 9 ans chez des chiens). Il existe de nombreux sérotypes peu toxiques pour l'organisme et chaque sérotype cible préférentiellement différents organes (par exemple, le sérotype 2 infecte préférentiellement les cellules musculaires et les neurones). Ils sont donc tout indiqués pour servir de vecteurs en thérapie génique des maladies affectant l'appareil musculaire ou le système nerveux.

Le principal inconvénient est qu'il faut injecter une grande quantité de virus afin d'obtenir une réponse thérapeutique significative et que cela provoque chez l'hôte une forte réaction immunitaire, d'autant plus précoce que ces virus sont très répandus dans la population humaine ou animale. Une étude réalisée en 2010 par Sylvie BOUTIN et son équipe révèle que 60% de la population humaine possède des anticorps anti-AAV1 et anti-AAV2. De nombreuses études sont en cours afin de trouver les sérotypes qui permettront une meilleure efficacité de transfection (en quantité) tout en limitant leur immunogénicité.

c. Les Retrovirus

Les retrovirus sont une famille de virus enveloppés à ARN simple brin. Ils possèdent tous une reverse transcriptase qui permet de transcrire leur matériel génétique en ADN, une intégrase qui permet l'intégration du matériel génétique viral au génome de la cellule infectée et trois gènes principaux : *pol*, *gag* et *env* qui codent respectivement pour la reverse transcriptase et l'intégrase, les protéines de la capsid et les protéines de l'enveloppe. Ils mesurent 80 à 130 nm de diamètre et leur génome fait de 8 à 11 kb. Les vecteurs fabriqués à partir de virus de la famille des *retroviridae* ne possèdent plus les gènes nécessaires à la réplication. Les vecteurs sont créés en présence de cellules possédant ces gènes (cellules transcomplémentantes), qui leur fournissent ainsi les protéines virales nécessaires à la construction des virions. Cependant, le signal d'encapsidation et les régions LTR (Long Terminal Repeat) qui bordent le génome de ces virus doivent être maintenus car elles interviennent dans plusieurs étapes importantes comme l'intégration et la régulation de la transcription du génome virale. En les conservant, on assure ainsi la bonne intégration et l'expression du transgène transporté par le vecteur.

On peut classer les rétrovirus en deux catégories : les simples et les complexes selon la diversité des protéines codées par le génome viral. En effet, les rétrovirus complexes sont capables de pénétrer dans le noyau cellulaire via un transport actif alors que les rétrovirus simples profitent de la mitose pour pénétrer le noyau. La figure 03 illustre le cycle de réplication des retrovirus.

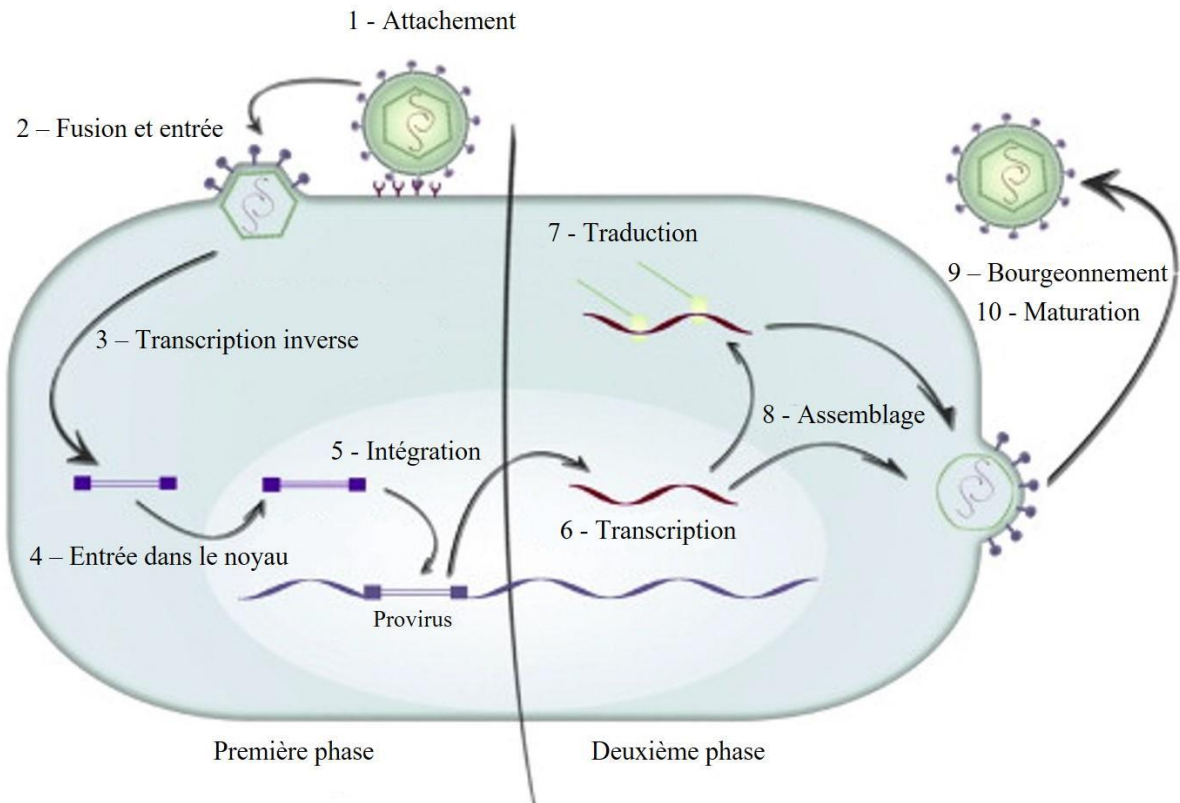


Figure 03 : cycle de vie des rétrovirus d'après SPENCER et PALMARINI (2012).

Dans le cas des virus enveloppés, et particulièrement dans le cas des retroviridae, on peut modifier le tropisme du vecteur viral en le pseudotypant.

Le pseudotypage est une technique qui consiste à modifier les glycoprotéines de surface des vecteurs viraux afin de modifier leur tropisme tissulaire. Cette technique est dérivée de la modification des enveloppes des virus lorsque deux types de virus (ou plus) infectent la même cellule. Lors du bourgeoisement, les virions des deux types se retrouvent porteurs de ses propres glycoprotéines ainsi que de celles de l'autre type de virus. On peut donc attribuer à un vecteur viral enveloppé la glycoprotéine que l'on souhaite pour pouvoir maîtriser son tropisme.

A ce jour, les glycoprotéines les plus utilisées en pseudotypage sont les glycoprotéines du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G). Ce virus possède un tropisme très large (presque tous les types cellulaires peuvent être infectés par un virus de la stomatite vésiculeuse) et une enveloppe très stable qui permet l'utilisation de l'ultracentrifugation pour concentrer le vecteur viral.

a. Les rétrovirus simples

Les rétrovirus simples ont été très utilisés au début des essais cliniques en thérapie génique comme vecteur car ils permettent une intégration stable du transgène dans le génome de l'hôte. Ils ne peuvent cependant infecter que des cellules en division. Cela en fait des vecteurs tout indiqués dans les thérapies géniques *ex vivo*. Plusieurs virus ont été utilisés avec succès comme vecteur en thérapie génique comme le virus de la leucémie murine de Moloney. Les vecteurs créés à partir de rétrovirus ont une capacité de 8kb. Leurs inconvénients sont cependant majeurs : ils sont immunogènes (comme la majorité des vecteurs viraux) et peuvent provoquer le déclenchement de cancers par activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène répresseur de tumeurs lors de l'insertion du transgène dans le génome cellulaire. Cela a été le cas lors de l'essai clinique conduit sur des enfants atteints du syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié à l'X (SCID X) en 2000. Onze enfants ont reçu par thérapie génique *ex vivo* le gène codant pour la chaîne γ du récepteur aux interleukines et ont été guéris du SCID X. Malheureusement, plusieurs cas de leucémies ont été rapportés dans les trois ans qui ont suivi l'essai clinique. Le déclenchement de la leucémie a été attribué à l'insertion du transgène au sein d'un proto-oncogène. Les rétrovirus simples sont donc relégués au second plan jusqu'à ce qu'on sache maîtriser leur lieu d'insertion dans le génome hôte.

b. Les lentivirus

Au sein des rétrovirus, les lentivirus (rétrovirus complexes) sont particulièrement étudiés en ce moment comme vecteurs en thérapie génique. On utilise en thérapie génique des « self-inactivating » lentivirus (ou SIN lentivirus) dont le génome a été modifié afin de les rendre incapables de se répliquer.

Les lentivirus ont la capacité d'infecter des cellules quiescentes grâce à des protéines virales capables de faire pénétrer leur matériel génétique dans le noyau des cellules cibles via les pores nucléaires, ce qui en fait des vecteurs de choix pour toutes les maladies impliquant des cellules hautement différenciées et qui se divisent peu, comme les neurones. Et comme tous les rétrovirus, ils sont capables d'insérer leur génome dans celui de la cellule hôte ce qui permet une expression à long terme du transgène. Cependant, cette insertion dans le génome des cellules hôtes a déjà eu pour résultat de provoquer des mutations chez les cellules cibles. Néanmoins, les lentivirus seraient moins susceptibles de provoquer ces mutations par insertion. En effet, ils insèrent naturellement leur matériel génétique près des sites de

transcription actifs alors que les autres rétrovirus ont plutôt tendance à s'intégrer près des promoteurs, ce qui augmente le risque d'oncogénèse. Il est aussi possible d'utiliser des lentivirus qui ne peuvent pas intégrer leur matériel génétique : ce sont les « Non Integrating LentiViruses » (NILVs). Dans ce cas-là, le transgène reste sous forme d'épisome dans le noyau cellulaire et l'expression à long terme du transgène est liée à l'état de quiescence des cellules infectées. Tout comme les rétrovirus simples, les vecteurs construits à partir de lentivirus ont une capacité de 8kb.

Malheureusement, les lentivirus induisent une forte réponse immunitaire de l'hôte à l'encontre du transgène ce qui diminue la durée de vie des cellules corrigées et donc l'effet thérapeutique. Une des pistes d'étude serait l'utilisation de microRNA pour induire une immunotolérance en empêchant l'expression du transgène dans les cellules présentatrices d'antigènes.