

## Vecteurs non viraux

### I-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*. Cependant, la possibilité demeure que ces virus introduits puissent recombinaison avec des rétrovirus endogènes, permettant une infection productive. De plus les adénovirus ne s'intègrent pas et les injections répétées peuvent entraîner une réponse immunitaire sévère envers l'adénovirus recombinant. 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.

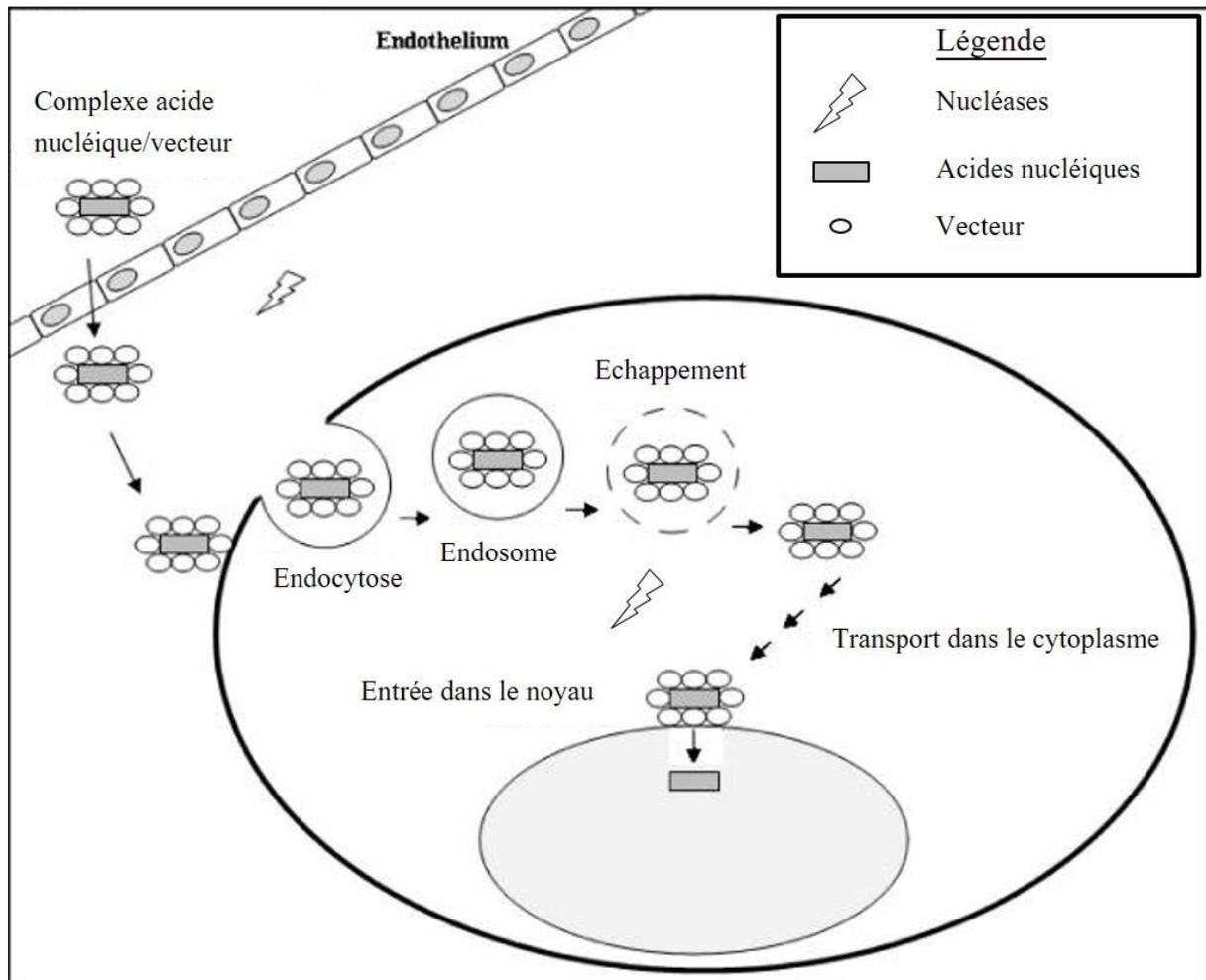
L'ADN thérapeutique non viral utilise des **plasmides bactériens** comme vecteurs d'expression génétique, et des **agents chimiques ou des méthodes physiques** comme vecteurs d'administration de ces plasmides. Les techniques non virales de transfert de gène thérapeutique présentent de nombreux avantages, en particulier le fait que cette approche ne génère pas de réponse immunitaire 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.

Les vecteurs non-viraux correspondent à une autre catégorie de vecteurs qui ont été développés pour répondre au besoin de disposer de vecteurs non pathogènes à la différence des virus. Leur production est souvent plus facile et moins coûteuse, mais les taux de transfection restent inférieurs à ceux atteints lors de l'utilisation d'un vecteur viral.

Les vecteurs non viraux doivent lever de nombreuses barrières afin de pouvoir être utilisés *in vivo* (Figure 1). Ils doivent avoir une demi-vie assez longue dans le système circulatoire et aussi pouvoir traverser la membrane plasmique. D'autres vecteurs non viraux provoquent une endocytose. Il est alors nécessaire que le vecteur puisse se libérer de l'endosome. Une fois dans le cytoplasme, le vecteur non-viral doit libérer le transgène et/ou le guider jusqu'au noyau cellulaire. Les mécanismes du fonctionnement de ces vecteurs ne sont pas encore tous élucidés (en particulier, le passage des acides nucléiques dans le noyau cellulaire après décomplexation). Cependant, seule une très petite quantité des molécules d'acides nucléiques du vecteur arrive à destination dans le noyau d'une cellule cible viable. Le taux de transfection réussie avec expression du transgène est très faible par rapport à celui obtenu avec des vecteurs viraux, en particulier lorsque les cellules cibles ne sont pas en division.



**Figure 1 :** Représentation des barrières qui limitent l'utilisation de vecteurs non viraux *in vivo* d'après AL-DOSARI et GAO (2009)

A la différence des virus, la plupart des vecteurs non-viraux ne sont pas naturellement spécifiques d'un type cellulaire et cela reste le plus grand défi à relever pour cette famille de vecteurs si on veut pouvoir l'utiliser *in vivo*.

### 1. Les vecteurs chimiques

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*.

## **Les lipides cationiques**

Les lipides cationiques sont des lipides formés par une chaîne hydrophobe et une tête hydrophile chargée positivement. Ce type de lipides s'est révélé être le plus efficace dans la fabrication de vecteurs en thérapie génique. Il est possible de former avec ces lipides des liposomes qui sont des bicouches lipidiques sous forme de micelles. L'ADN chargé négativement interagit avec les charges positives des lipides et crée spontanément des lipocomplexes ou lipoplexes.

A la différence de la production de vecteurs viraux, les lipides cationiques sont très peu coûteux à produire. Ils ne sont pas pathogènes et provoquent une faible réponse immunitaire. Ils sont capables de transporter de grande quantité d'ADN (voire des chromosomes entiers) et peuvent être modifiés afin de cibler des cellules spécifiques via des lipoprotéines ou des anticorps insérés dans la bicouche lipidique. Cependant, on observe une certaine cytotoxicité lors de fusion avec les membranes cellulaires (plasmique, endosomale ou lysosomale) due à la présence du groupement hydrophile chargé positivement, le plus souvent une amine tertiaire ou quaternaire. A cause du mécanisme de clairance hépatique (demi-vie très courte des liposomes), on n'observe qu'un faible taux de transfection. Lors d'injection systémique, les liposomes peuvent provoquer des réactions d'hypersensibilité. L'addition de certains composés chimiques (comme le polyéthylène glycol) permet de réduire leur toxicité tout en les stabilisant.

Des liposomes sont actuellement fabriqués et vendus par différents laboratoires : la Lipofectamine 2000<sup>®</sup> est un liposome commercialisé par le laboratoire Life Technologies, fréquemment utilisé comme gold standard lors d'études sur un nouveau vecteur non viral.

## **Les polymères cationiques**

Les polymères cationiques sont des assemblages de macromolécules (comme des hydrocarbures, des monosaccharides, ...) modifiés par différentes réactions chimiques afin de posséder les groupements chimiques nécessaires à leur fonction (ici, des groupements cationiques). Ils forment des polyplexes quand ils sont associés à de l'ADN. Ils sont, à la différence des lipides cationiques, totalement solubles dans l'eau et ont l'avantage de pouvoir condenser l'ADN en des particules de petite taille, ce qui semble permettre une transfection plus efficace. Les polymères à base de chaînes hydrocarbonées hydrophobiques se sont montrés les plus aptes au transport d'acides nucléiques. Les polymères sont des molécules faciles à modifier par l'ajout ou le retrait de différents groupements ce qui en fait un sujet d'étude très vaste. Il est possible, comme avec les liposomes, de leur adjoindre des

groupements permettant le ciblage tissulaire. Les groupements amine et arginine semblent être déterminants dans le mécanisme d'échappement aux endosomes même si le mécanisme reste encore obscur.

Cependant, plus leur capacité à transfecter les cellules augmente (présence de groupes hydroxyl, le ratio charges positives/ADN, longueur des chaînes de carbone ...), plus leur toxicité est élevée. Des moyens pour diminuer cette cytotoxicité sont à l'étude comme l'utilisation de polyéthylène glycol pour entourer les nanoparticules. De nombreux polymères sont à l'étude, le polyéthylèneimine (PEI) et le polypropylèneimine étant les plus étudiés. Des travaux ayant pour objectif de les modifier pour diminuer leur toxicité et augmenter leur capacité de transfection sont en cours. D'autres études se concentrent sur les polymères à base de chaînes aliphatiques de carbonates (succession de groupes - O - C (O) - O).

### **Les polymères biodégradables**

Il est démontré que les polymères biodégradables (comme les poly-amido-amines) ont une plus faible cytotoxicité que les polymères et lipides cationiques. Afin de créer des polymères biodégradables, il faut créer des liaisons hydrolytiques ou bioréductibles au sein du polymère notamment par l'addition de groupement disulfide. Cela réduit jusqu'à cent fois la toxicité du polymère par rapport à un polymère classique comme le polyéthylèneimine.

Il est également possible d'utiliser des macromolécules biocompatibles ;

Le **chitosane** (dérivé de la chitine) est un polysaccharide très étudié car biodégradable, biocompatible et qui possède des charges positives. Cependant, sans modification il reste peu performant comme vecteur. Mais associé à différents groupements, le chitosane devient un support très prometteur.

La **gélatine** (dérivée du collagène animal) est déjà très utilisée dans l'industrie pharmaceutique en raison de ses caractères biocompatible et biodégradable. Elle est approuvée par la FDA et est très peu chère à produire. Des études ont montré qu'il était possible de créer des nanoparticules de gélatine capables de transporter des acides nucléiques (par encapsulation, complexation avec des groupements de surface ou par attraction électrostatique). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré le potentiel de la gélatine comme vecteur non viral par rapport à l'ADN nu et la Lipofectamine®. Cependant, la majorité de la gélatine produite vient de l'industrie animale ce qui rend ce produit susceptible de transmettre des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles. De la gélatine humaine recombinante est disponible sur le marché et considérée comme moins à risque. Cette gélatine est plus homogène et semble mieux convenir à la préparation de nanoparticules. A l'heure

actuelle, la gélatine est surtout étudiée pour le transport de médicaments de nature autre que les acides nucléiques.

### **Les nanoparticules de phosphate de calcium**

Le plus grand avantage de ces nanoparticules est qu'elles sont totalement biocompatibles et biodégradables car le phosphate de calcium est un élément présent chez les animaux et l'Homme sous forme d'os. Des études *in vitro* ont montré la capacité des nanoparticules de phosphate de calcium à transporter des acides nucléiques et à transfecter les cellules. Ces nanoparticules nécessitent une préparation spéciale afin d'éviter la précipitation ou l'agglomération et des modifications de surface pour les stabiliser *in vivo*.

## **2. Injection directe/bombardement de particules**

L'utilisation d'acides nucléiques dits nus (car non liés à une autre molécule) comme vecteur non viral en thérapie génique est pratiquée depuis plus de vingt ans. L'ADN nu ne provoque pas de réponse immunitaire et est facile à produire via des systèmes bactériens et les techniques d'ADN recombinant. On crée alors des plasmides recombinants contenant une origine de réplication, un promoteur et la séquence d'intérêt. Une des limites principales de l'utilisation des acides nucléiques nus est qu'ils ont une demi-vie très courte en raison de l'action des nucléases endogènes. L'autre limite est que l'expression du transgène est transitoire la plupart du temps. Plusieurs hypothèses ont été formulées à ce sujet :

- Activation du système immunitaire contre le plasmide par des séquences d'ADN bactérien résiduelles (qui ne présentent pas de méthylation)
- Inactivation du promoteur s'il est viral. Les promoteurs viraux sont très utilisés (par exemple, la séquence LTR des rétrovirus) car il est démontré que ces derniers provoquent une expression massive du transgène à la différence des promoteurs tissu-spécifique.
- Nombreuses mitoses induisant la perte du transgène non intégré

Grâce à des méthodes physiques pour améliorer la transfection, le taux d'expression du transgène peut atteindre celui d'une transfection par vecteur viral.

### **Micro injection**

Cette technique consiste à injecter directement les transgènes nus par le biais d'une solution d'acides nucléiques dans le cytoplasme ou le noyau des cellules grâce à des aiguilles de 0.5 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre et un microscope optique spécialisé appelé micromanipulateur. Cette

technique est lourde à réaliser et se retrouve donc reléguée derrière les autres méthodes physiques. Elle est aujourd'hui surtout utilisée en transgénèse animale.

### **Gene gun**

La technique du « gene-gun » (ou pistolet à gènes) consiste à injecter dans les tissus cibles, à très grande vitesse, grâce à un gaz pressurisé, des microparticules d'or ou de tungstène (1 à 3 µm de diamètre) recouvertes d'acides nucléiques. Cette méthode a été développée pour la création de plantes transgéniques dans les années 80. Cependant, il a été démontré que l'utilisation de cette méthode provoquait une réponse immunitaire plus importante que celle induite par la micro-injection d'ADN et ce, avec un apport d'une quantité d'acide nucléique moindre. Actuellement, la technique du « gene-gun » est essentiellement utilisée dans la vaccination à partir de gènes ou vaccination ADN.

### **Technique hydrodynamique**

Cette technique consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse (les quantités dépendent du modèle animal choisi). Cette technique a été initialement décrite en utilisant la veine de la queue comme voie intraveineuse. Le mécanisme est le suivant : l'injection rapide d'un bolus provoque une congestion du cœur ce qui fait refluer le sang et le bolus dans le système veineux (veine cave inférieure et veine porte principalement). L'augmentation de la pression veineuse provoque une dilatation des fenestrations des capillaires sanguins irrigant le foie et perméabilise les membranes plasmiques permettant ainsi l'entrée des acides nucléiques. Tous les paramètres systémiques reviennent à la normale en quelques minutes et les membranes plasmiques sont restaurées en 48 à 72h.

Par cette technique, les hépatocytes sont les cellules qui présentent l'expression génétique du transgène la plus importante. Des cellules du cœur, des poumons, de la rate et des reins montrent aussi une expression, mais 10 000 fois inférieure aux hépatocytes. Cette technique est aussi utilisable pour transfecter d'autres tissus comme des muscles en bloquant la circulation sanguine le temps de l'injection. On peut utiliser des plasmides d'ADN ou d'autres molécules (siARN, oligonucléotides, ...). Le taux de transfection est de 30% à 40%, ce qui est le taux le plus important décrit en utilisant un vecteur non viral.

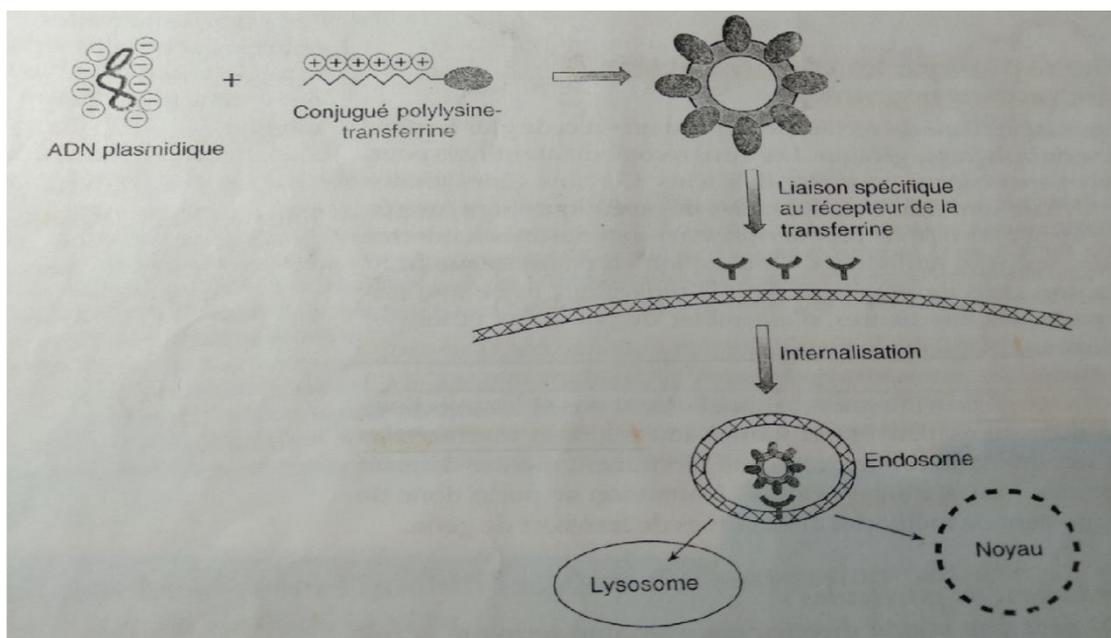
## Electroporation

L'électroporation consiste à appliquer un courant électrique à un tissu pour faciliter l'entrée des acides nucléiques dans les cellules en créant des pores membranaires.

Il a été démontré que les courtes impulsions (100 $\mu$ s) de haut voltage permettaient de perméabiliser les membranes plasmiques et que les longues impulsions (100ms) de bas voltage permettaient de guider l'ADN dans les cellules. Le voltage dépend du type d'application (directe ou en transcutané), du modèle d'étude ainsi que du tissu (les hépatocytes semblent résister à un courant plus fort que les cellules musculaires), sachant qu'il doit rester assez faible afin de ne pas détruire les cellules transfectées. Cette technique est principalement utilisée *in vitro*. L'utilisation *in vivo* se limite aux cellules cutanées.

## 3. Endocytose médiée par un récepteur

L'ADN est couplé à une molécule de ciblage qui peut se lier à un récepteur cellulaire de surface spécifique (figure 2), entraînant l'endocytose et le transfert de l'ADN dans les cellules. Ce couplage est normalement réalisé grâce à une liaison covalente d'une polylysine à la molécule de récepteur et à la liaison réversible de l'ADN chargé négativement au composant polylysine chargé positivement. Par exemple les hépatocytes présentent à leur surface un récepteur asialoglycoprotéine qui capte les asialoglycoprotéines du sérum. Le couplage de l'ADN à une asialoglycoprotéine, par un polycation comme la polylysine, peut cibler le transfert d'ADN exogène dans les hépatocytes.



**Figure 2 :** Transfert de gène par endocytose médiée par un récepteur.