

# **Chapitre VII: Méthode de transfert des gènes en thérapie génique & adénovirus vecteurs**

# Plan

---

- I. Introduction
- II. Technique des transferts des gènes, vecteurs viraux
  - II.1. Rétrovirus
  - II.2. Adénovirus
  - II.3. Virus adéno-associés
  - II.4. Vecteurs synthétiques
- III. Méthodes physiques

# Plan

---

- I. Introduction

# Introduction

---

- La thérapie génique est un vaste domaine de recherche, porteur d'espoir pour un grand nombre de maladies. Si les outils et les approches envisagés doivent être adaptés à la pathologie ciblée, les découvertes et améliorations technologiques apportées aux agents de transfert de gènes permettent sans cesse d'élargir leurs champs d'applications. C'est pourquoi il est important d'avoir une vue d'ensemble des moyens actuels de la thérapie génique et leurs champs d'applications à l'heure actuelle.

# Stratégies & approches de thérapie génique

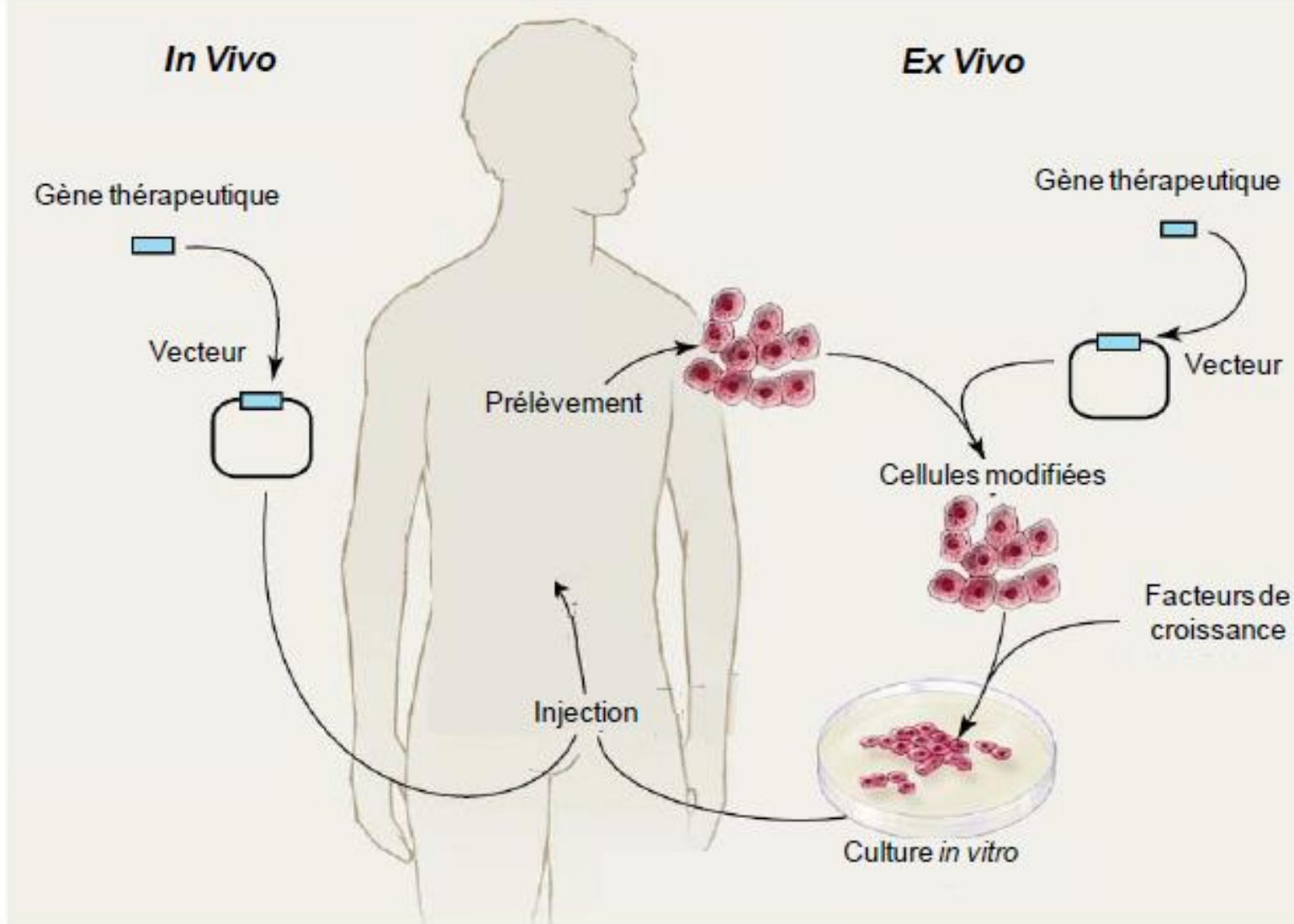
---

- En fonction du type de maladie de sa physiopathologie ainsi que de l'organe/tissu cible, il existe à l'heure actuelle deux grandes stratégies de thérapie génique, qui peuvent se conjuguer avec différentes approches. Les deux stratégies concernent l'administration des gènes (Figure 1).

# Thérapie génique *ex vivo*

---

- Consiste à prélever les cellules du patient, à les modifier en y apportant le gène d'intérêt thérapeutique, puis à les lui réimplanter (après amplification) afin que celles-ci se développent et remplacent peu à peu les cellules malades. Cette stratégie fut la première mise en œuvre chez l'Homme, et reste particulièrement attractive concernant les cancers hématopoïétiques, en raison de l'accessibilité des cellules souches sanguines.



**Figure 1 : Modes d'administration de gènes à visée thérapeutique (modifiée d'après Kaji and Leiden, 2007) Approche *ex vivo*** . Les cellules déficientes (ou leurs progéniteurs) sont prélevées, puis modifiées par introduction du transgène et multipliées, avant d'être réimplantées chez le patient afin de s'y développer et de remplacer peu à peu les cellules déficientes. **Approche *in vivo***. Le gène thérapeutique (couple ou non à un vecteur) est administré directement chez le patient par injection locale ou intraveineuse.

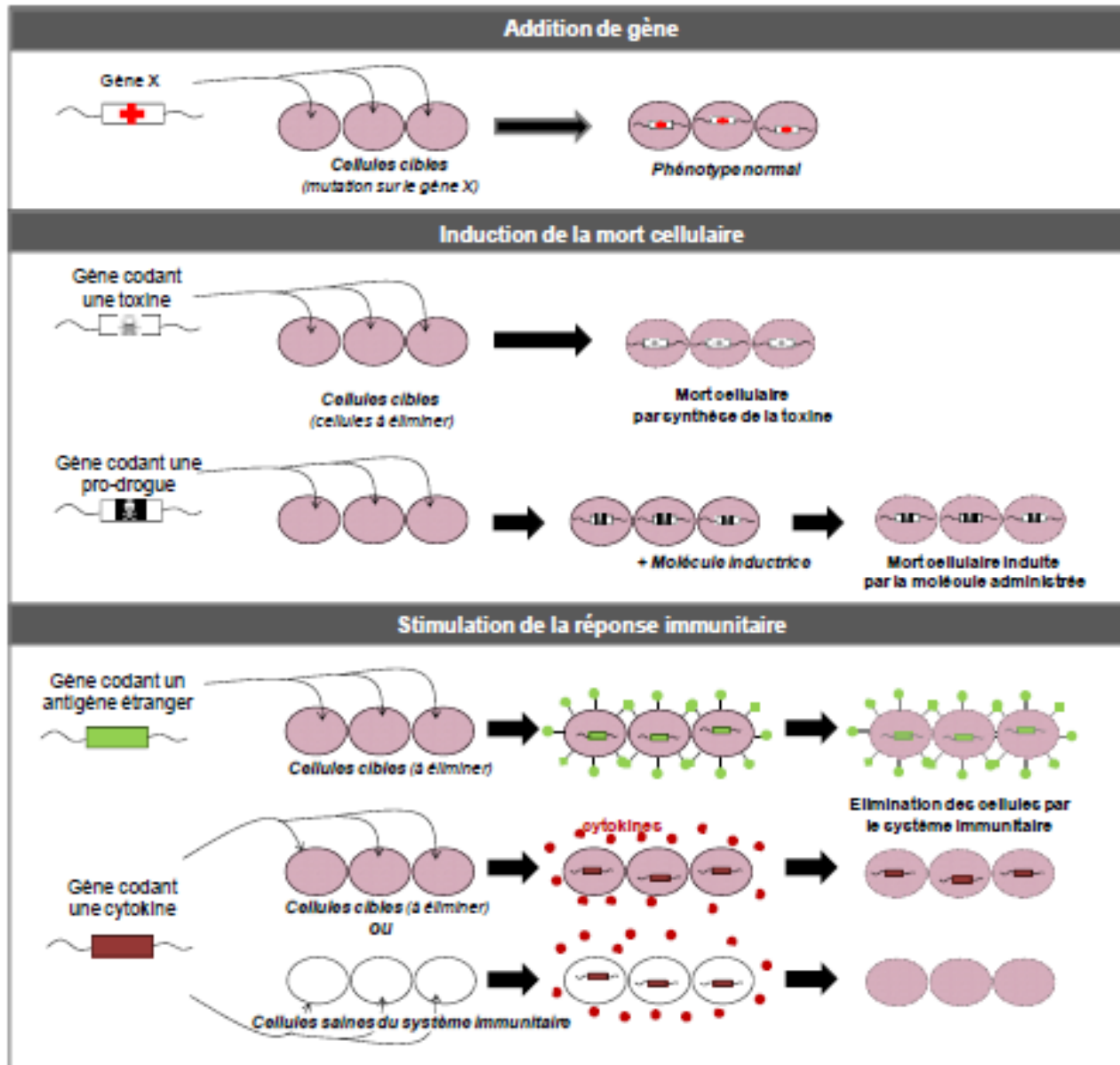
# Thérapie génique *in vivo*

---

- Cette seconde stratégie consiste en l'administration directe du gène thérapeutique chez le patient, par délivrance locale ou intraveineuse. D'une manière générale, la quantité de matériel nécessaire (vecteur et/ou ADN) est souvent plus importante que celle requise pour la stratégie *ex vivo* car la cible peut être vaste et/ou difficile d'accès. De plus, plusieurs administrations du produit de thérapie génique peuvent être nécessaires pour obtenir, ou maintenir, l'effet thérapeutique escompte. Ce type de protocole présente l'avantage de ne pas obligatoirement nécessiter d'intervention chirurgicale, mais exige de choisir un vecteur efficace, ainsi que la voie d'administration la plus adaptée.
- En fonction de l'effet escompte, différentes approches de thérapie génique ont été envisagées, les principales étant schématisées sur la figure 2.

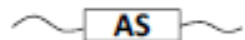


# Figure 2: Quelques approches majeures de la thérapie génique



## Inhibition de l'expression d'un gène cible ou rétablissement d'un transcrit fonctionnel

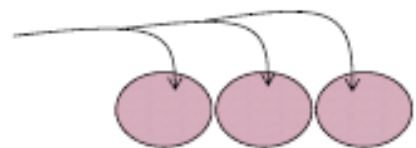
Séquence nucléique codant un ARN anti-sens



Ou



ODN anti-sens, ribozyme...



Cellules cibles



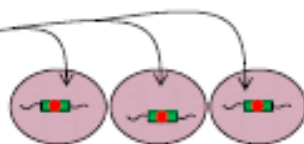
Blocage de l'expression  
d'un gène pathogène



ou saut d'un exon portant une anomalie génétique  
(synthèse d'une protéine tronquée mais fonctionnelle)

## Correction ciblée de mutations

Séquence nucléique portant  
une séquence correctrice



Cellules cibles  
(à corriger)



Restauration d'un phénotype normal  
(mutation génétique corrigée)

**L'addition de gène, envisagée des les débuts de la thérapie génique** comme traitement pour les maladies monogéniques, continue d'être l'approche dominante pour une majorité d'entre elles. Il s'agit d'apporter dans la cellule cible une "copie" saine du gène dont la mutation est responsable de la pathologie. En pratique, on a le plus souvent recourt à un vecteur (viral ou non viral) pour apporter dans les cellules du sujet une séquence d'ADN homologue de la séquence normale du gène d'intérêt (ADN complémentaire, ADNc).

Lorsqu'on cible des pathologies tumorales ou infectieuses, ou l'effet recherché est d'induire la **mort cellulaire**, on peut également envisager **l'apport d'une copie d'un gène codant une** protéine toxique pour la cellule, ou le transfert d'un gène portant la cassette d'expression d'une enzyme (ex : HSV/TK) qui, en présence d'une molécule inductrice comme le Ganciclovir va aboutir à la mort des cellules modifiées et des cellules adjacentes (par effet *by-stander*). Comme cela a été évoqué dans la partie introductive, l'apport de certains gènes peut également permettre de **stimuler le système immunitaire afin qu'il identifie les cellules cibles** comme du non-soi, et procède à leur élimination.

# Plan

---

- II. Technique des transferts des gènes, vecteurs viraux

# Techniques de transfert des gènes vecteurs viraux

---

- Les virus sont des vecteurs naturels puisque leur propriété essentielle est d'accéder au noyau des cellules hôtes, d'y transférer leur matériel génétique (ADN ou ARN) et d'exploiter la machinerie cellulaire afin de se répliquer et se disséminer dans l'organisme. C'est pourquoi les premiers espoirs de thérapie génique furent liés à la compréhension de leur mécanisme d'action et leur première utilisation comme véhicule de gènes. Le principe consiste à amputer certaines séquences du virus qui codent les protéines indispensables au cycle infectieux pathogène, et n'y laisser que les séquences permettant de construire la particule virale et d'assurer le cycle d'infection. On parle alors de virus « sécurisés ». Le génome du virus est enfin modifié pour porter le gène thérapeutique

- Le génome du virus est enfin modifié pour porter le gène thérapeutique. Les protéines virales qui pourraient potentiellement manquer à la formation des particules virales thérapeutiques sont fournies par des cellules dites productrices, ou « d'encapsidation », pendant la phase *in vitro* de production des vecteurs.

Approximativement deux tiers des essais cliniques utilisent un vecteur viral, il n'en demeure pas moins que cette approche présente souvent des inconvénients comme la taille limitée du transgène, la difficulté de production en masse (cout, variabilité dans les lots produits), tout comme des risques liés aux réactions immunogènes et inflammatoires induites chez l'hôte ou à une intégration non contrôlée de l'ADN viral dans le génome du patient. Différents types de virus sont utilisés. Parmi eux, citons ici les vecteurs dérivés des adénovirus, des virus associés aux adénovirus (AAV), des virus de l'herpès, et des rétrovirus (parmi lesquels les lentivirus).

# Plan

---

- II.1. Rétrovirus



# Rétrovirus

---

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, de 110 à 125 nm de diamètre. Ils possèdent un patrimoine génétique sous forme d'un double brin d'ARN, rétrotranscrit en ADN lors du cycle d'infection. Ces virus sont impliqués dans de graves pathologies humaines telles que les leucémies ou le SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise). C'est pourquoi les rétrovirus recombinants utilisés comme vecteurs (le plus souvent issus de virus murins) sont modifiés de façon à conserver les séquences LTRs (*Long Terminal Repeats*) nécessaires à leur intégration dans les chromosomes de la cellule hôte, ainsi que la séquence  $\Psi$  permettant l'encapsidation, mais sont en revanche dépourvus des séquences gag, pol et env. nécessaires à la réplication.

Le nouveau gène se transmet alors de cellule mère en cellule fille de manière égale, sans « dilution » de l'information génétique dans le temps.

Cependant, de nombreux inconvénients restent liés à leur utilisation. Parmi eux, nous pouvons citer la relativement faible capacité d'incorporation d'un exogène (8 kb) et le manque de spécificité cellulaire. En effet, les protéines de l'enveloppe sont capables de se lier à de nombreux récepteurs à la surface de différents types cellulaires. De plus, l'intégration aléatoire de leur génome peut conduire à l'activation d'oncogènes conduisant à la défaillance du cycle cellulaire, comme ce fut le cas des « bébés bulles » ayant développé une leucémie. Enfin, la plupart de ces virus n'infectent que les cellules en division, ce qui compromet fortement leur utilisation, étant donné que les cellules cibles en thérapie génique sont souvent des cellules qui ne se divisent pas ou peu (cellules souches sanguines, cellules musculaires, neurones, cellules du foie, cellules de l'épithélium pulmonaire, ...). En raison de ces limites, l'utilisation des vecteurs rétroviraux traditionnels est restée jusqu'ici restreinte au transfert de gènes *ex vivo*.

# Plan

---

- II.2. Adénovirus

# Adénovirus

---

- Les adénovirus sont des virus nus à ADN double brin de 36 à 40 kb, d'environ 90 à 100 nm de diamètre, capables d'entrer dans les cellules par endocytose grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques. Aujourd'hui, plus de 50 sérotypes humains ont été mis en évidence dont la plupart sont des pathogènes respiratoires mineurs. Ce tropisme naturel pour l'appareil respiratoire fait de ce type de vecteurs un bon candidat pour la thérapie génique de la mucoviscidose. Capables de transporter de relativement grands fragments d'ADN (jusqu'à 30 kb) dans les cellules quiescentes et en division, ces vecteurs transfèrent leur ADN de façon épisomale, éliminant ainsi tout risque de mutagenèse insertionnelle.

# Plan

- II.3. Virus adéno-associés

---

- **Virus adéno-associés**

- Les virus adénoassociés (AAVs) appartiennent à la famille des parvovirus, et sont de petits virus (20 à 25 nm de diamètre) à ADN simple brin de 4,7 kb, non pathogènes pour l'homme, qui furent découverts en tant que contaminants d'adénovirus en 1966; À l'heure actuelle, 12 sérotypes d'AAV sont connus chez l'homme, mais c'est le sérotype 2 (AAV2) qui est le plus connu sur le plan moléculaire et virologique. Son génome est constitué de deux séquences terminales inversées-répétées (ITRs) de 145 nucléotides, ainsi que de deux gènes. Ces derniers utilisent différents sites d'initiation de la traduction ainsi que l'épissage alternatif pour coder plusieurs protéines : le gène rep code quatre protéines impliquées dans le cycle viral (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40), et le gène cap code trois protéines de structure (VP1, VP2 et VP3) nécessaires à l'encapsidation du génome viral

# Conclusion

---

- Les vecteurs viraux sont des vecteurs naturels très efficaces pour le transfert de gènes, en termes de délivrance mais aussi d'expression. Pour cette raison, ils sont utilisés dans la majorité des essais cliniques de thérapie génique. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients que les chercheurs essaient de contourner. En effet, le transport d'un exogène de grande taille est difficile, certains virus engendrent des réactions immunitaires qui empêchent une quelconque re-administration, tandis que d'autres peuvent être pathogènes par mutagenèse insertionnelle ou peuvent le devenir par recombinaison entre le vecteur viral et certaines séquences virales intégrées dans le génome hôte. Enfin, leur production et leur manipulation restent compliquées et coûteuses. Tous ces facteurs ont encouragé les chercheurs à trouver une alternative plus sûre aux vecteurs biologiques, telle que l'utilisation de méthodes dites « physiques », ou de vecteurs synthétiques.

# Plan

---

II.4. Vecteurs synthétiques



# Vecteurs synthétiques

Etant donné que les vecteurs viraux sont certes efficaces mais présentent divers inconvénients majeurs, et que les méthodes physiques de transfert de gènes s'appliquent difficilement aux organes profonds, les recherches se sont orientées en parallèle vers la mise au point de vecteurs synthétiques, obtenus par synthèse chimique. Il s'agit pour la grande majorité d'entre eux de molécules cationiques capables d'interagir de façon électrostatique avec l'ADN chargé négativement. Il en résulte la formation de complexes nanométriques vecteur/ADN qui peuvent être internalisés par les cellules. L'ADN, en général un plasmide comportant une cassette d'expression eucaryote du transgène, est alors libéré dans le cytoplasme puis transcrit après migration dans le noyau.

# Plan

---

- III. Méthodes physiques

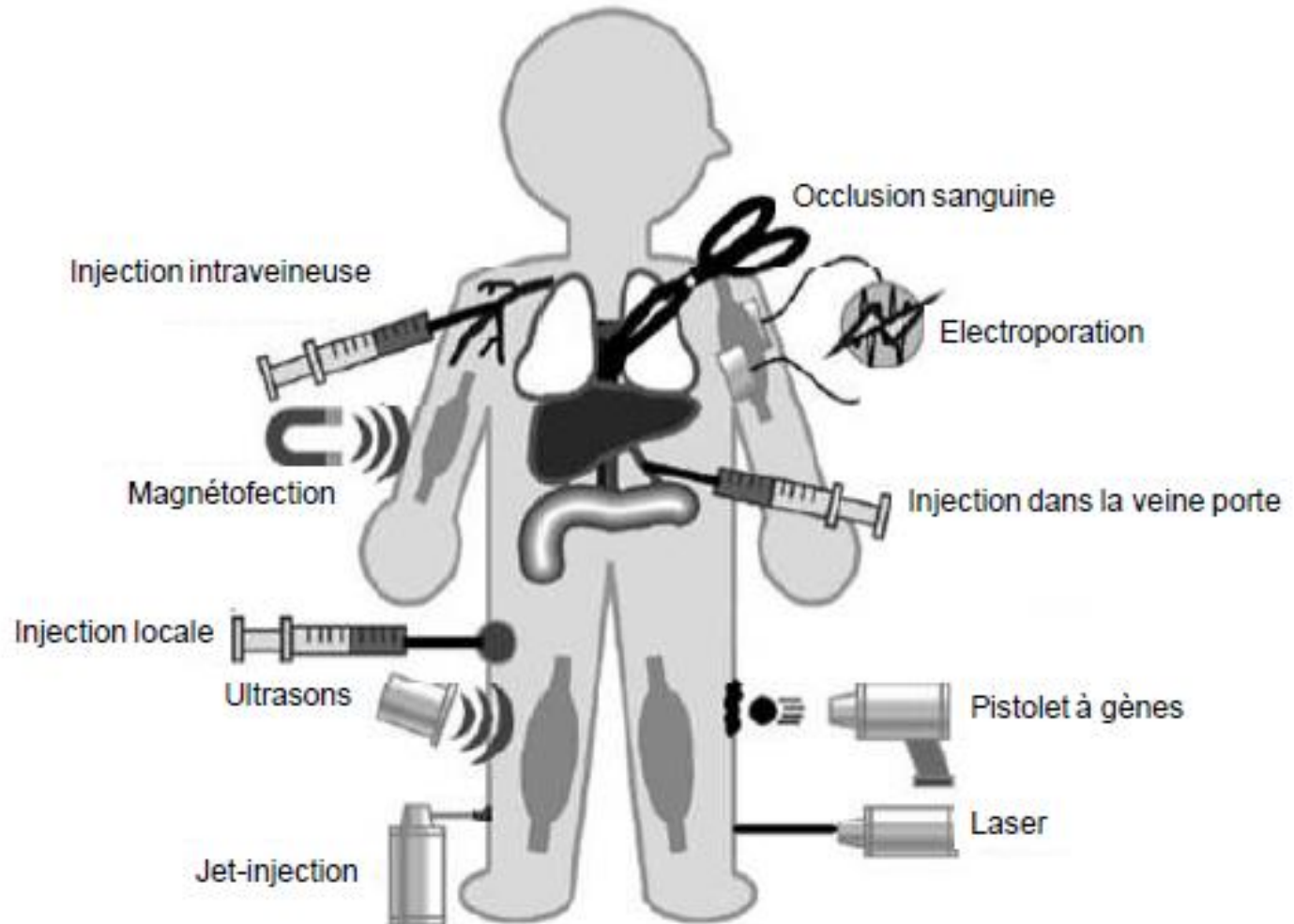
# Méthodes physiques

---

- L'administration d'ADN médicament « nu » est non seulement la méthode la plus simple pour administrer du matériel génétique, mais c'est également la plus sûre car l'ajout de toute molécule différente du soi augmente le risque de réponse immunitaire chez l'hôte. De nombreuses techniques dites « physiques » ont été développées pour favoriser l'entrée des acides nucléiques dans des organes isolés ou dans un organisme entier.

# Figure 3: Principales méthodes physiques de transfert des gènes.

---



# Méthodes physiques

## ADN nu

---

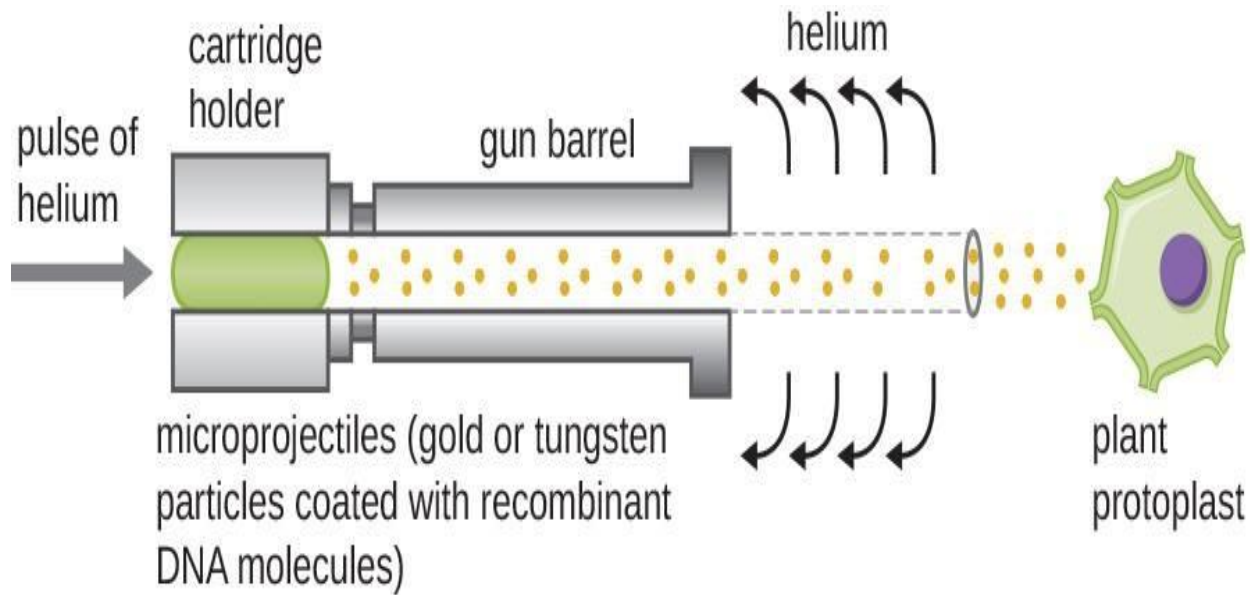
- En raison de sa nature polyanionique, on a longtemps pensé que l'ADN ne pouvait franchir passivement les membranes cellulaires, elles aussi chargées négativement. Mais au début des années 1990, des expériences ont montré qu'un transgène pouvait être exprimé dans les cellules musculaires pendant une durée d'au moins deux mois, suite à une simple injection intramusculaire d'ADN. Cependant, cette technique reste peu efficace puisque moins de 1 % de la dose injectée est internalisée par les cellules, et l'expression reste localisée au niveau du site d'injection. Cette stratégie semblait par conséquent restreinte aux organes directement accessibles tels que la peau ou le muscle.

# Méthodes physiques

## • **Canon à ADN**

---

• Le canon à ADN (ou gène gun) consiste à adsorber de l'ADN nu autour de particules métalliques inertes de 1 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre (d'or ou de tungstène), et les propulser à l'aide d'un gaz sur les cellules ou le tissu cible. Cette technique, utilisée pour la première fois sur des cellules végétales à la fin des années 1980 fut étendue aux cellules et tissus mammifères au début des années 1990. Une étude récente a permis de trouver une alternative à l'introduction de métaux, non biodégradables, dans l'organisme (figure 4).



(a)



(b)

**Figure 4:** Schéma d'un canon à gènes (a) et une photographie (b). Des particules de métal lourd recouvertes d'ADN recombinant sont injectées dans des protoplastes de plantes à l'aide d'un canon à gènes.

# Méthodes physiques

## • Jet injection

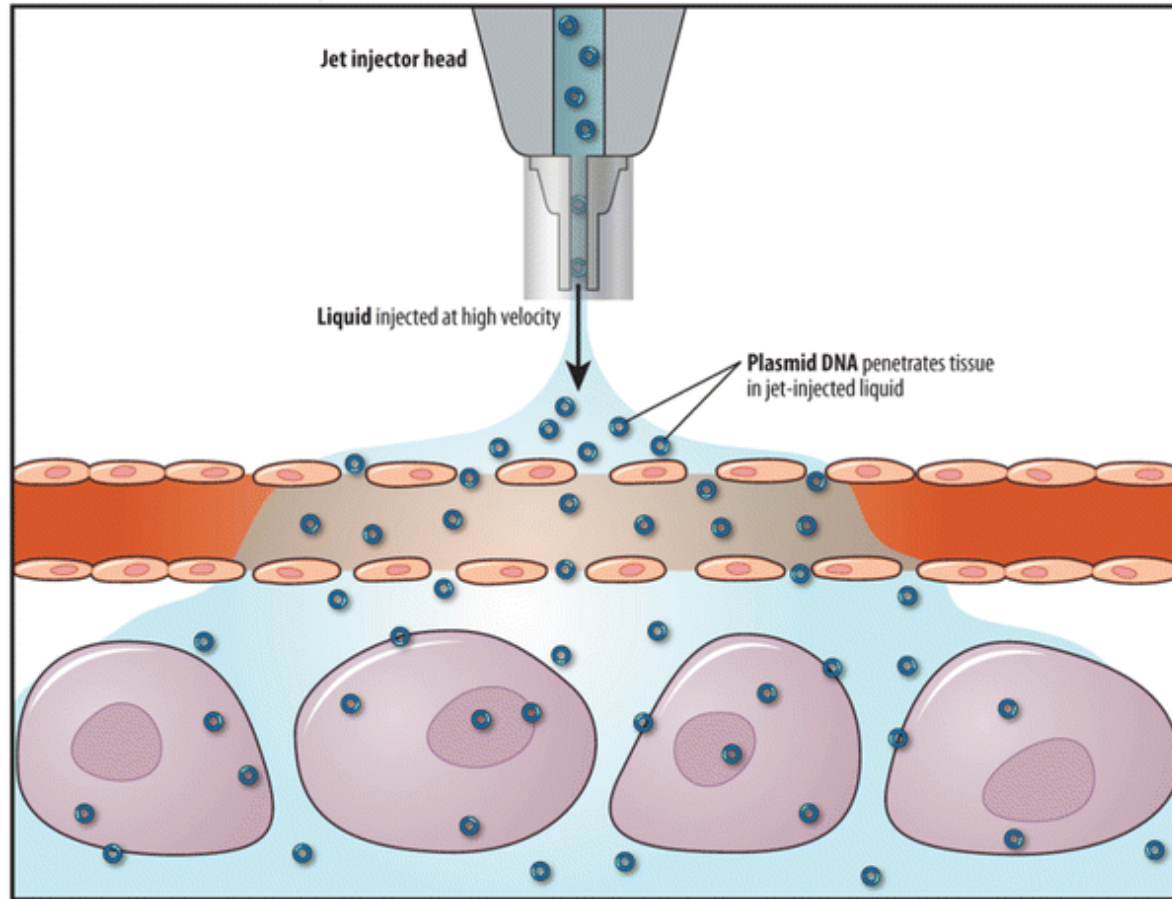
- jet injection est un moyen d'administration locale de substances, permettant d'éviter tout recours à une aiguille. A l'heure actuelle, cette technique n'est utilisée que pour la délivrance d'hormones, d'anesthésiants locaux, d'insuline ou pour l'immunisation (figure 5).



# Figure 5: Technique de Jet injection.

---

Jet Injection Delivery



# Jet injection (suite)

---

- L'application à jet de liquide est essentiellement un concept de dispositif qui accélère et disperse le traitement sur un site myocardique ciblé. L'hypothèse de base proposée est que cette approche, avec des paramètres optimisés, pourrait entraîner une rétention thérapeutique accrue au cours de la phase de délivrance initiale. Ceci aurait théoriquement pour résultat une expression myocardique totale par dose, tout en offrant un profil plus homogène autour du site d'injection.

# Méthodes physiques

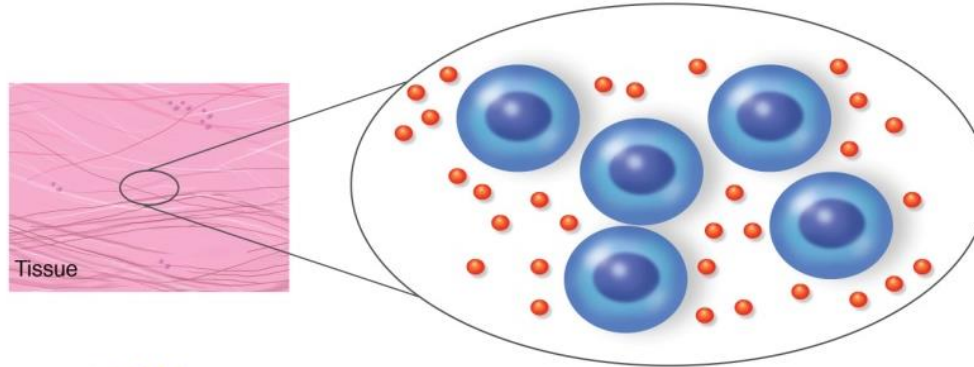
## Sonoporation

---

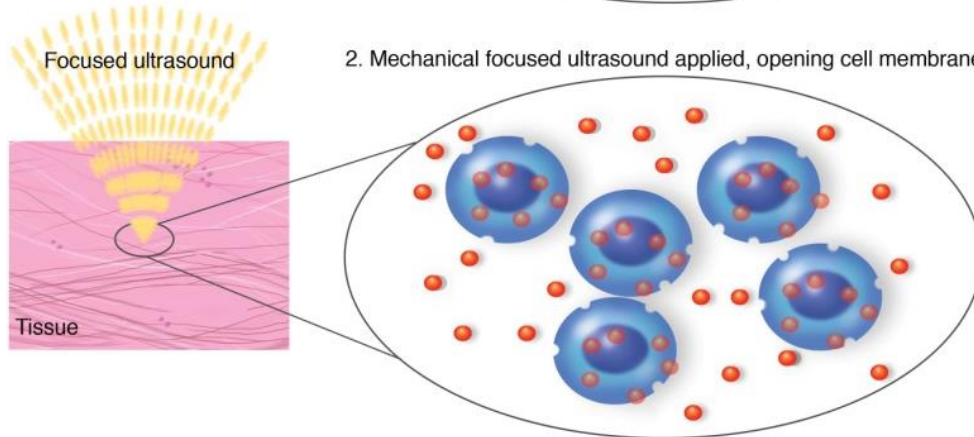
- La sonoporation est une technique consistant à appliquer des ultrasons de façon à perméabiliser les membranes cellulaires et ainsi augmenter la pénétration de molécules d'intérêt. Dans le cadre du transfert de gènes, l'ADN nu est en général co-injecté avec des microbulles (de 1 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, initialement utilisées comme agents de contraste dans l'imagerie par ultrasons) qui sont constituées de protéines, de lipides ou de polymères, et remplies d'air ou d'un gaz inerte. Les microbulles Optison™ (GE Healthcare) sont par exemple constituées de perfluoropropane, encapsulé dans une sphère d'albumine humaine (figure 6).

# Figure 6: Technique de sonoporation

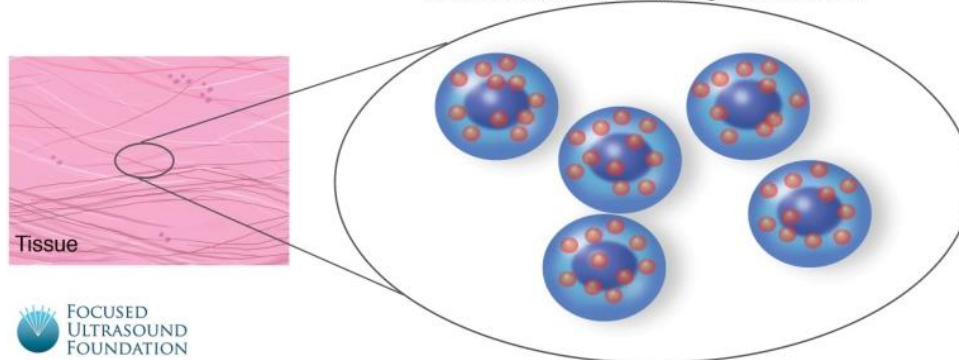
1. Cells surrounded by drug molecules



2. Mechanical focused ultrasound applied, opening cell membranes



3. Cell membranes close, drug remains in cell



# Méthodes physiques

## Electroporation

- L'électroporation utilise l'effet de courtes impulsions d'un champ électrique pour induire une électroperméabilisation transitoire des membranes cellulaires, et permettre la pénétration d'acides nucléiques ou autres molécules d'intérêt. Cette méthode de transfert d'ADN est utilisée depuis le début des années 1980, *in vitro et in vivo*, principalement à destination de la peau et du muscle (mélanome, vaccination)]. Néanmoins, cette technique a également été testée pour le transfert d'ADN au niveau de l'épithélium pulmonaire de souris et de mouton, permettant une expression du transgène 100 fois plus forte qu'après administration d'ADN nu (figure 7).

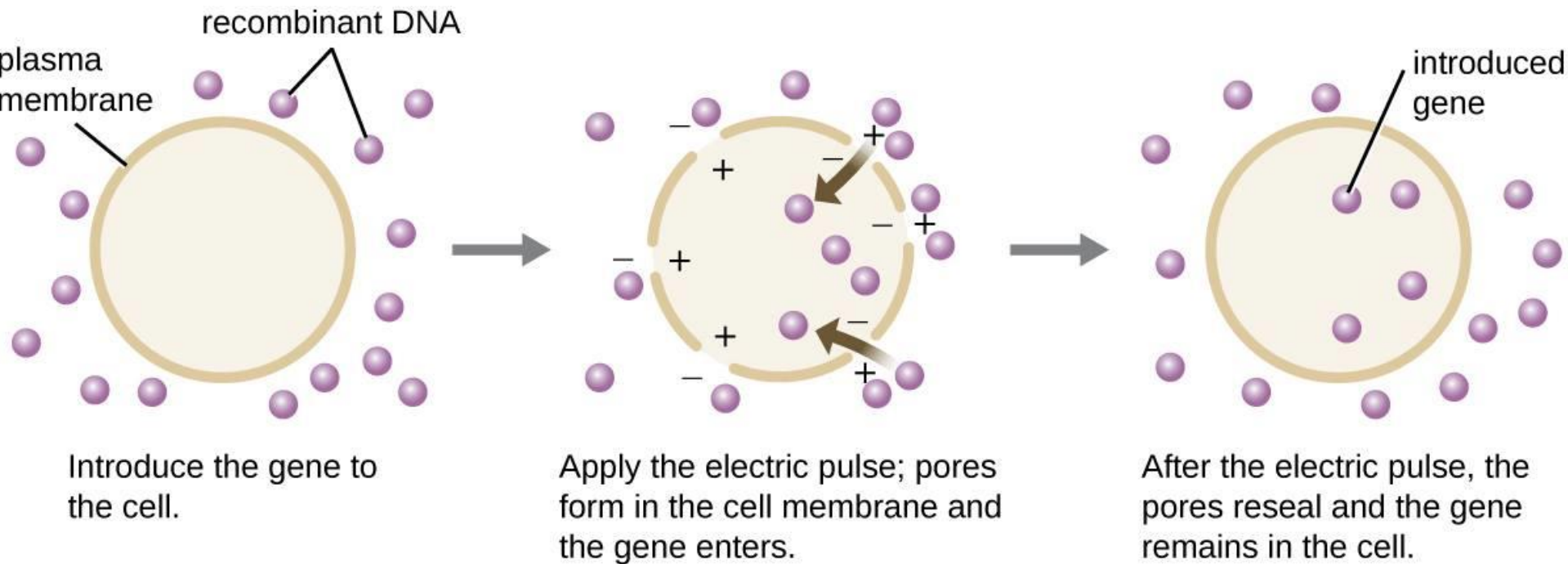


Figure 7: Etapes de l'électroporation.

# Méthodes physiques

## Magnétofection

---

- Cette technique fait appel à l'utilisation d'un fort champ magnétique à des nanoparticules magnétiques (à base d'oxyde de fer) sur les membranes des cellules cibles, l'ADN parvenant alors à entrer à l'intérieur des cellules. Cette technique a également été utilisée en combinaison avec des vecteurs biologiques (viraux) et synthétiques (lipides, polymères) dans plusieurs essais *in vitro* et *in vivo* (figure 8)

# Figure 8: Etapes de magnétofection

