

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République algérienne démocratique et populaire

Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

Université Mohammed Sedik Ben Yahia - Jijel

Faculté de sciences de la nature et de la vie

Département : Biologie Moléculaire et Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

**Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Thème**

**La thérapie génique et les maladies  
génétiqnes**

**Membre de jury**

**Président : Dr. AISSAOUI S.**

**Examineur : Pr. RECHRECHE H.**

**Encadreur : BENSGHIER S.**

**Présenté par :**

**BOUNAR Siryne.**

**MERABET Kenza.**

**Année universitaire : 2017-2018**

## ***Remerciement***

Avant tout nous remercions ALLAH qui nous a aidés pour effectuer ce travail.

Nos remerciements sont adressés tout particulièrement à notre encadreur Mme *Bensghier Salima* pour l'aide et le temps qu'elle a voulu nous consacrer pour ses lectures et ses conseils.

Nous tenons à remercier très sincèrement l'ensemble des membres du jury qui nous font le grand honneur d'accepter de juger notre travail.

Nous adressons mes plus sincères remerciements à *Ines* et *Zohra* pour leurs conseils précieux, leurs lectures attentives et leurs orientations.

Nous voudrions aussi exprimer ma gratitude à tout le personnel de la bibliothèque de la faculté de biologie, en particulier *Lyazid* et *Nadjat* pour leurs disponibilités, leurs aides et leurs encouragements

Et enfin, nous tenons à adresser nos vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration du présent mémoire.

*Syrine et kenga*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail ;*

♥ *A la mémoire de mon père*

*Que ce travail soit une preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*

♥ *A ma mère qui n'a jamais cessé de m'encourager, et à qui je dois la vie et une part essentielle de ma personnalité.*

*Puisse ce travail être une petite récompense pour tous les nobles sacrifices que t'es imposée pour assurer notre bien être et notre éducation.*

*Que dieu te prête une longue vie, santé et bonheur pour que tu restes la splendeur de ma vie.*

♥ *A mon grand frère ADAM que j'aime beaucoup.*

♥ *A mes sœurs ZOHRA et ALIMA que j'adore.*

♥ *A ma nièce ma petite princesse CATALEYA*

♥ *mes amis : Kenza, Ines, Ibtisame et Asma*

♥ *A toute ma promotion.*

♥ *Et a tous ceux que j'aime et qui m'apportent joie et sérénité.*

*Siryna*

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A mes amis Naima, siryne. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.*

***kenza***

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b>	Thérapie par augmentation des gènes.....	05
<b>Figure 2:</b>	Correction de la mutation du gène.....	06
<b>Figure 3:</b>	Inhibition de l'expression génique.....	07
<b>Figure 4:</b>	Concepts de thérapie génique in vivo et ex vivo.....	08
<b>Figure 5:</b>	Vecteur rétroviraux.....	11
<b>Figure 6:</b>	Vecteurs lentivirus.....	12
<b>Figure 7:</b>	Vecteurs Adénovirus.....	13
<b>Figure 8 :</b>	Vecteurs adéno-associés.....	14
<b>Figure 9:</b>	Représentation schématique d'un lipide cationique.....	16
<b>Figure 10:</b>	Structure de lipoplexe.....	17
<b>Figure 11:</b>	Principales méthodes physiques du transfert de gènes.....	18
<b>Figure 12 :</b>	Mode de transmission de l'hémophilie A.....	23
<b>Figure 13:</b>	Le facteur VIII.....	24
<b>Figure 14 :</b>	Modèles animaux de l'hémophilie.....	24
<b>Figure 15 :</b>	Diagramme schématique de la thérapie génique plaquettaire de l'hémophilie A.....	32
<b>Figure 16 :</b>	Structure de la dystrophine.....	34
<b>Figure 17 :</b>	Construction de gène minidystrophine hautement tronqués.....	37
<b>Figure18:</b>	Exemple de saut d'exon chez un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) présentant une délétion de l'exon 50.....	39



## Liste des abréviations

**AAV** : Adeno-associated vectors.

**ADA** : Adénosine désaminase.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AO** : oligonucléotides antisens.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger.

**BDD** : B-Domain-Deleted

**CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance.

**CMV** : Cytomégalovirus.

**DAP**: Protein associated with dystrophin.

**DMD** : Myodystrophie de Duchenne.

**FVIII** : Facteur VIII

**FIX** : Facteur IX

**HA** : Hémophilie A

**F8** : Gène codant pour le facteur VIII

**FvW** : Facteur de von Willebrand

**FVIIIa** : Facteur VIII activé.

**GRMD**: Golden Retriever muscular dystrophy.

**HSC**: Hematopoietic stem cell.

**LTR**: long terminal repetition.

**MCK:** Muscle creatine kinase.

**MLV:** vector of murine leukemia

**MoMLV:** Moloney murine leukemia virus.

**PEI:** Polyéthylèneimine.

**PEG:** Polyéthylène glycol.

**PM:** Poids moléculaire.

**PMO:** phosphorodiamidate morpholino oligomère.

**SCID:** Severe combined immunodeficiency.

**WPRE:** Woodchuck post-transcriptional regulatory element.

**mDYS:** Mini-dystrophine.

**μDYS:** Micro-dystrophine.



# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Partie 1 : Les principes de la thérapie génique</b>	
<b>I. Thérapie génique</b> .....	03
I.1. les débuts de la thérapie génique.....	03
I.2. Les premières réussites.....	04
I.3. Catégories de thérapie génique.....	05
<b>II. Modalités d'utilisation de la thérapie génique</b> .....	06
II.1. Addition d'un gène.....	06
II. 2. Remplacement d'un gène.....	07
II.3. Réparation des gènes.....	07
II.4. Destruction de cellules.....	07
II.5. Inhibition de l'expression génique.....	07
II.5.1. Thérapie anti-sens.....	08
II.5.2. Thérapie par les ribozymes.....	08
<b>III. Modalités d'administration de la thérapie génique</b> .....	09
III.1. Thérapie génique in vivo.....	09
III.2. Thérapie génique ex vivo.....	09
III.3. Thérapie génique in situ.....	10
<b>IV. Outils de transfert de gène</b> .....	10
IV.1. Vecteurs de transfert de gènes.....	10
IV.1.1. Vecteurs viraux.....	10
IV.1.1.1. Vecteurs rétroviraux.....	11
IV.1.1.2. Lentivirus.....	13
IV.1.1.3. Adénovirus.....	13
IV.1.1.4. Vecteurs viraux adéno-associés.....	14
IV.1.1.5. Virus de l'herpès simplex.....	15
IV.1.2. Vecteurs synthétique.....	15
IV.1.2.1. Lipides cationiques.....	16
IV.1.2.2. Polymères cationiques.....	17
IV.2. Méthodes physiques.....	18
IV.2.1. ADN nu.....	18
IV.2.2. Pistolets géniques.....	19
IV.2.3. Électroporation.....	19
IV.2.4. Magnétofection.....	19
IV.2.5. Ultrason.....	19
IV.2.6. Hydrodynamique.....	20
<b>Partie 2 : Application de la thérapie génique</b>	
<b>I. L'hémophilie A</b> .....	21
I.1. La maladie.....	21
I.2. Modèles animaux.....	24

I.3. Utilisation de la thérapie génique.....	27
I.3.1. Les premiers essais cliniques.....	27
I.3.1.1. Les rétrovirus simples.....	27
I.3.1.2. Les adénovirus.....	28
I.3.2. Nouveaux vecteurs.....	29
I.3.2.1. Virus adéno-associé(AAV).....	29
I.3.2.2. Utilisation des lentivirus.....	30
I.3.2.3. Utilisation de vecteurs non viraux.....	30
I.3.2. Nouvelles méthodes.....	31
<b>II. Dystrophine musculaire de Duchenne.....</b>	<b>33</b>
II.1. Maladie.....	33
II.2. Modèles animaux.....	35
II.3. Utilisation de la thérapie génique.....	36
II.3.1. Remplacement du gène.....	36
II.3.2. Le saut d'exon.....	38
II.3.3. Modification de l'expression des gènes.....	40
<b>Conclusion.....</b>	<b>41</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>42</b>
<b>Annexes</b>	

# Introduction

La thérapie génique est une biotechnologie définie comme la procédure utilisée pour traiter ou améliorer l'état de santé du patient en modifiant génétiquement les cellules du patient. Il fournit une approche unique pour traiter les maladies héréditaires et acquises en délivrant un matériel génétique thérapeutique et ses éléments régulateurs associés dans le noyau, afin de corriger la perte de fonction causée par une mutation ou d'exprimer le produit du gène déficient à des niveaux physiologiques. Il est bien documenté que presque toutes les maladies humaines se produisent en raison d'un défaut dans un seul gène ou un ensemble de gènes dus à une mutation [1].

Apparue de la thérapie génique comme une question dans les recherches dès 1976, elle a connu un essor exponentiel à partir de 1990 avec les premiers tests cliniques chez l'homme dans le traitement de déficit immunitaire sévère (SCID). Les succès incontestables obtenus chez des patients souffrant de pathologies ADA-SCID ou X-SCID (l'immunodéficiência combinée sévère liée à l'X) se sont suivis malheureusement de complications comme des leucémies chez certains patients atteints de X-SCID. Ces constatations soulignent les difficultés d'obtenir une méthode de thérapie génique fiable pour la médecine de demain. Cette découverte, ces expériences et les promesses d'énormes possibilités qu'elle apporte la thérapie génique ont motivé notre choix pour ce thème [2].

En dépit de diverses méthodes ou types de thérapie génique, la thérapie commence par l'identification du gène mutant qui est responsable de la cause de la maladie. Le gène thérapeutique est adapté au besoin d'augmenter, de supprimer ou de réparer. Une fois le gène thérapeutique produit, il est chargé dans un véhicule appelé vecteur. La fonction du vecteur est de délivrer le gène thérapeutique à la cellule cible du patient. Ces vecteurs divisés en deux grandes catégories, à savoir les vecteurs viraux et non viraux (virus synthétiques) [3].

Ce concept de thérapie génique a été initialement destiné aux maladies génétiques monogéniques, dans lesquelles des mutations causales dans un gène donné sont responsables de la maladie que présente le patient comme hémophilie et dystrophie musculaire de Duchenne. L'application de la thérapie génique aux maladies génétique repose sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la maladie et l'identification de cibles pouvant être modifiées par modulation de l'expression génique. D'où notre problématique est posée sur : *« Est-ce que la thérapie génique pourrait être utilisée et efficace dans l'avenir comme un traitement pour les maladies génétiques ? »*

Et pour répondre à cette problématique, nous subdivisons notre mémoire en deux parties :

- la première partie, intitulée « **Les principes de la thérapie génique** » sera consacrée pour présenter les généralités, les stratégies et les techniques nécessaires à la mise en place d'un traitement de thérapie.
- La deuxième partie intitulée « **Application de la thérapie génique** », sera présentée des exemples de la thérapie génique sur deux maladies génétiques, l'hémophilie et dystrophie musculaire de Duchenne.

# Partie I

## **Principes de la thérapie géniques**

## I. Thérapie génique

### I.1. Début de la thérapie génique

Depuis ses débuts, la thérapie génique oscille entre espoir et déception. Le concept de la thérapie génique est simple puisqu'il consisterait dans l'idéal à apporter un gène réparateur dans une cellule ou un tissu où l'action d'une protéine fait défaut. Le mode de réalisation et les progrès en ce domaine, faisant intervenir des expertises complexes et multidisciplinaires ont probablement été moins rapides qu'attendu. Il n'en reste pas moins que les promesses d'options thérapeutiques basées sur ces biothérapies, sont susceptible de concerner parmi les plus rares et les plus graves des maladies humaines [4, 5].

Par définition, son histoire est liée à celle de la génétique et de la biologie moléculaire. La première identification d'une mutation d'un gène chez l'homme dans les années 1960, la capacité de transfert d'ADN au sein de cellules, d'obtention de l'expression du gène correspondant et la compréhension des mécanismes essentiels de régulation de l'expression des gènes ont été autant d'étapes préalables [6].

En 1970, l'usage précis des enzymes de restrictions est maîtrisé et on rêve alors de modifier la structure de l'ADN [7].

En 1973, réalisation du premier transfert de gène sur une bactérie très commune : *Escherichia coli* [7].

Dans les années 1980, assiste à une première tentative de thérapie génique sur l'Homme. Le docteur Cline, de l'Université de Californie à Los Angeles, tente ce premier essai pour soigner deux cas de thalassémie Béta-Zéro [7].

En 1990, début du premier essai clinique impliquant la thérapie génique, était deux filles de quatre ans traitée au Centre Clinique de NIH. Utilisant des rétrovirus recombinants pour traiter une forme sévère autosomique récessive d'immunodéficience combinée (SCID) due à un déficit en adénosine désaminase (ADA), l'essai a été salué comme un succès, mais les patients avaient aussi été traités en parallèle par un remplacement standard d'enzyme combinée au polyéthylène glycol (PEG-ADA) [6,8].

En 1999, Mort de Jesse Gelsinger, quelques jours seulement après avoir reçu des particules d'adénovirus recombinant par injection intra-hépatique dans un essai clinique de thérapie génique pour le déficit en ornithine transcarbamylase, une réponse immunitaire massive aux particules d'adénovirus a entraîné une insuffisance de multiples organes [8].

En 2000, le premier succès sans ambiguïté de la thérapie génique concernait l'utilisation de rétrovirus recombinant pour traiter une forme liée à l'X de SCID. Toutefois, plusieurs des enfants traités développèrent une leucémie, avec un décès due à l'activation d'un oncogène cellulaire par insertion [9].

En 2006, succès transitoire de la thérapie génique utilisant un rétrovirus pour traiter deux patients adultes atteints d'une maladie granulomateuse chronique, une maladie récessive qui affecte la fonction des phagocytes et provoque une immunodéficience, en dépit du succès initial, l'expression du transgène s'est éteint chez les deux patients et ils développèrent une myélodysplasie due à l'activation insertionnelle d'un oncogène cellulaire, 27 mois après la thérapie génique, un des patients est décédé suite à une septicémie galopante [8,10].

Dans même année, succès limité de thérapie génique de l'hémophilie B, des vecteurs AAV2 ont été utilisée avec succès pour la transduction d'hépatocytes pour exprimer un transgène du facteur IX, une réponse immunitaire à la destruction des cellules exprimant le transgène [11].

En 2009, le premier succès d'une thérapie génique pour une maladie du système nerveux central qui est l'adrénoleucodystrophie liée à X, et la première utilisation d'un vecteur antiviral. En outre, le deuxième succès d'une thérapie génique *in vivo*, utilisant une injection dans la rétine d'AAV recombinant pour traiter une amaurose congénitale de Leber, une forme de cécité de l'enfance, le gain de vision significatif après traitement était maintenu après un an [8].

## **I.2. Première réussite**

La première tentative partiellement réussie de thérapie génique est à mettre au crédit d'une équipe française, celle des professeurs Fischer et Cavazzana-Calvo, de l'hôpital Necker, à Paris. En 2000, ils réussirent à traiter avec succès deux enfants-bulles atteints d'une maladie génétique appelée X-SCID. Ces enfants ont un déficit immunitaire important qui les rend plus sensibles aux infections de toutes sortes et les oblige à vivre dans un environnement stérile (une bulle). Le traitement, répété les années suivantes sur une douzaine d'enfants au total, permit à la quasi-totalité



de ces enfants de sortir de leur bulle et de mener une vie normal. Malheureusement, en 2002, les deux enfants traités développèrent une forme de leucémie due au traitement [12].

Bien que le succès de cette tentative ne soit que partiel, elle est considérée par la communauté scientifique et médicale comme une première médicale incontestable. Il faut voir cette expérience comme une preuve de principe, c'est-à-dire qu'il désormais possible de traiter des patients par un gène-médicament. En revanche, il ne faut pas considérer que la technique est au point ; au contraire, l'essentiel de la mise au point reste à faire. Depuis, d'autres tentatives ont aussi été couronnées de succès à travers le monde. Mais, comme il a été souligné, ce type de traitement étant destiné à des patients qui en auront besoin tout au long de leur vie, il serait imprudent de crier victoire trop vite [12 ,13]

### **I.3. Catégories de thérapie génique**

Le terme de thérapie génique regroupe donc les thérapeutiques biotechnologiques visant à réparer une anomalie de l'ADN ou faisant exprimer une protéine thérapeutique.

La thérapie génique est une nouvelle approche de traitement ou de prévention des maladies qui utilise le gène comme médicament. En apportant un gène « normal », on permet ainsi à la machinerie cellulaire de reproduire une protéine « thérapeutique » en quantité suffisante. On utilise le terme de « normal » car il s'agit d'introduire le gène qu'aurait du avoir la personne pour fonctionner de manière saine et viable. Quant au terme de « thérapeutique », il est utilisé car on restaure bien une fonction physiologique [14].

La thérapie génique utilise un gène qu'elle introduit dans des cellules du malade. Selon la nature des cellules touchées, on distingue deux méthodes :

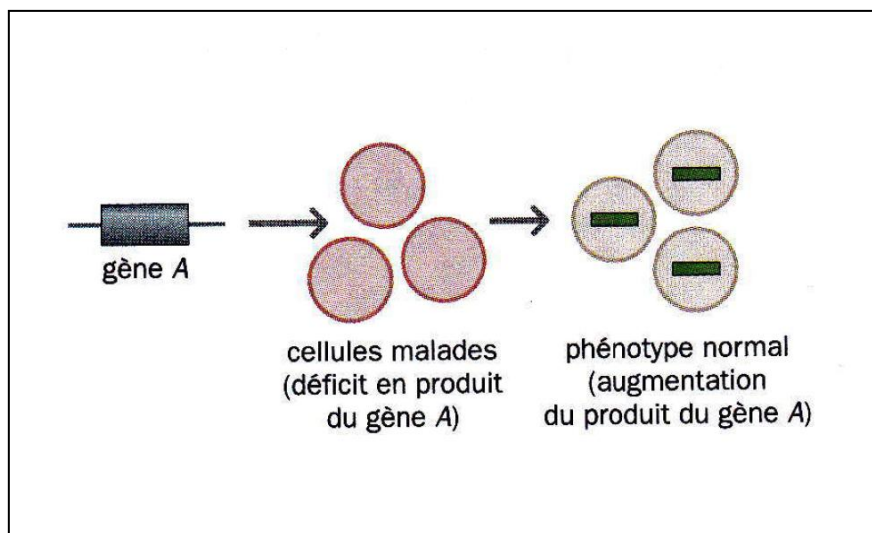
- **Thérapie génique germinale, ou thérapie génique sexuelle :** Consisterait à appliquer la thérapie génique à un embryon, au stade où celui-ci est forme d'un amas de cellules, ou aux cellules germinal (ovules, spermatozoïdes) d'un adulte. Le gène introduit serait alors transmis à toutes les cellules filles des premières cellules embryonnaires, c'est-à-dire à toutes les cellules du futur individu il y'aurait donc modification du patrimoine génétique de l'espèce humaine. De plus, les cellules germinales du futur individu étant touchées comme les autres, le nouveau patrimoine serait transmis héréditairement à toute sa descendance [15].

- **Thérapie génique somatique :** Ce sont les thérapies les plus courantes qui s'intéressent aux gènes des cellules dites somatiques, c'est-à-dire les cellules non reproductrices. La thérapie génique somatique permet de remplacer le gène défectueux dans les cellules somatiques et n'a d'incidence que sur la personne traitée. Ceci signifie que tous les effets du traitement sont logés à l'individuel étant traité et ne sont pas hérités par la future progéniture [7].

## II. Modalités d'utilisation de la thérapie génique

### II.1. Addition d'un gène

L'addition d'un gène consiste à insérer dans le noyau cellulaire ou directement dans le génome de la cellule hôte un nouveau gène, qu'on appelle transgène (figure 1). Dans la plupart des cas, l'expression du transgène permet à la cellule de produire son propre médicament. Cette méthode ne fonctionne que si la maladie est due à une protéine non ou peu fonctionnelle. Elle concerne surtout les maladies génétiques autosomiques récessives comme la mucoviscidose [16].



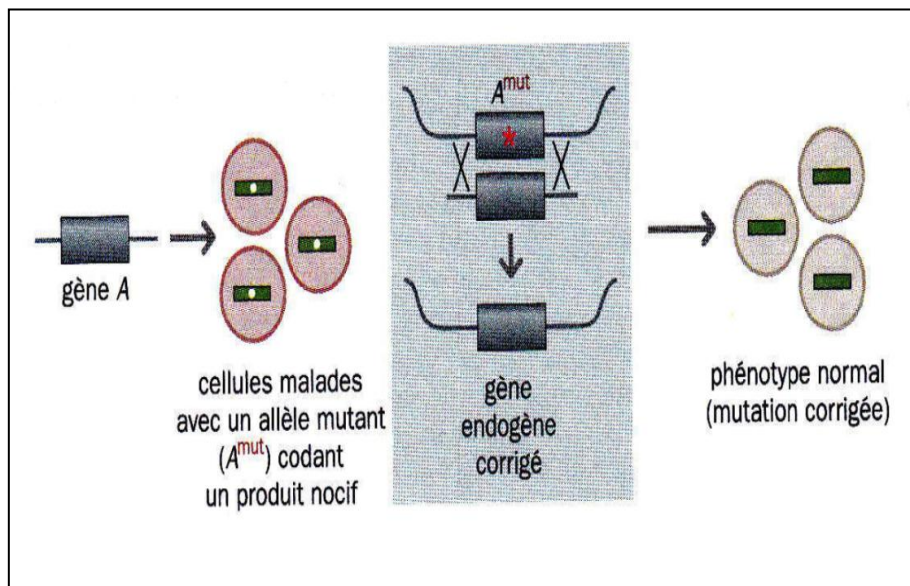
**Figure 1:** Thérapie par augmentation des gènes [8].

### II.2. Remplacement d'un gène

Cette méthode est la plus appropriée pour corriger les mutations avec perte de fonction, entraînant l'absence de produits génique ou la production d'une protéine non fonctionnelle, l'insertion d'un gène normale permet d'apporter la protéine manquant [17]. Certaines maladies monogéniques pourraient être traitées de cette façon. Par exemple, la mucoviscidose, les myopathies ou les maladies génétiques du système immunitaire [18].

### II.3. Réparation des gènes

L'objectif de la réparation des gènes est de restaurer la fonction d'un gène muté. Le gène peut être repéré au niveau de l'ADN en remplaçant une séquence contenant la mutation pathogène par la séquence équivalente normale (figure 2). Ce type de correction de gène s'applique à une maladie avec gain de fonction dans laquelle le gène mutant résidant a une action effectivement dangereuse sur les cellules ou les tissus. Une autre possibilité, est d'induire un épissage modifié du gène qui éliminerait l'exon porteur de la mutation nocive [8].



**Figure 2:** Correction de la mutation du gène [8].

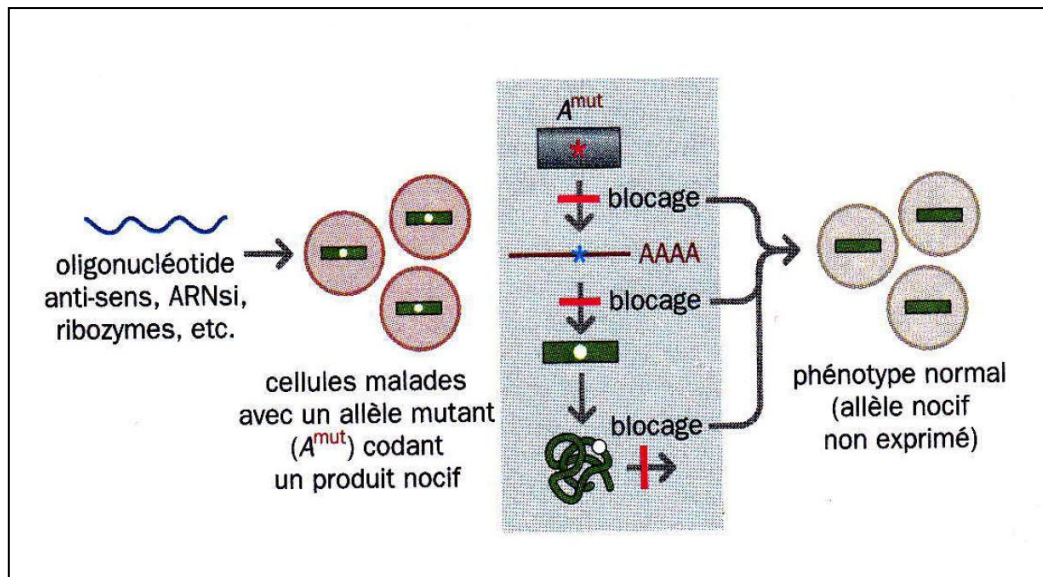
### II.4. Destruction de cellules

Cette approche est particulièrement adaptée au traitement de cancer [8]. Elle s'effectue en introduisant un gène apoptotique ou indirectement en sensibilisant par exemple des cellules cancéreuses à des médicaments par introduction dans les cellules cancéreuses un gène qui code pour une enzyme activant un médicament inactif administré au patient, ce médicament activé détruit alors les cellules cancéreuses [18].

### II.5. Inhibition de l'expression génique

Elle est utilisée spécialement pour traiter les maladies infectieuses en ciblant les fonctions essentielles de l'agent pathogène et les cancers en inhibant les oncogènes qui sont activés [8].

Les méthodes de blocage de l'expression génique ont fait l'objet de différents travaux et certain d'entre eux s'avèrent prometteurs (figure 3).



**Figure 3 :** Inhibition de l'expression génique [8].

### II.5.1. Thérapie anti-sens

Le principe est simple, il consiste en la synthèse d'un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire de la séquence d'un ARN messager (ARNm) contenant une mutation avec un gain de fonction. Cet oligonucléotide « anti-sens » se lie à l'ARNm anormal, empêchant sa traduction en protéine pathogène. Les oligonucléotides anti-sens peuvent également être conçus afin de se lier à l'ADN double brin contenant la mutation pathogène, créant une triple hélice qui ne peut pas être transcrite en ARNm. L'une des difficultés de cette technique provient du fait que les oligonucléotides sont dégradés avant qu'ils ne puissent atteindre leur cible. Néanmoins, la thérapie anti-sens a été testée dans certain nombre de protocoles, par exemple, elle a été utilisée pour bloquer l'expression de l'oncogène KRAS dans les tumeurs pancréatiques et colorectales, et également comme inhibiteurs de l'expression du virus de l'hépatite C [17].

### II.5.2. Thérapie par les ribozymes

Les ribozymes sont des molécules d'ARN, dont certaines d'entre elles ont la capacité de cliver l'ARNm. Elles peuvent être synthétisées pour interrompre des séquences d'ARNm spécifiques qui contiennent une mutation, ce qui permet de les détruire avant qu'elles ne puissent être traduites en protéine [17].

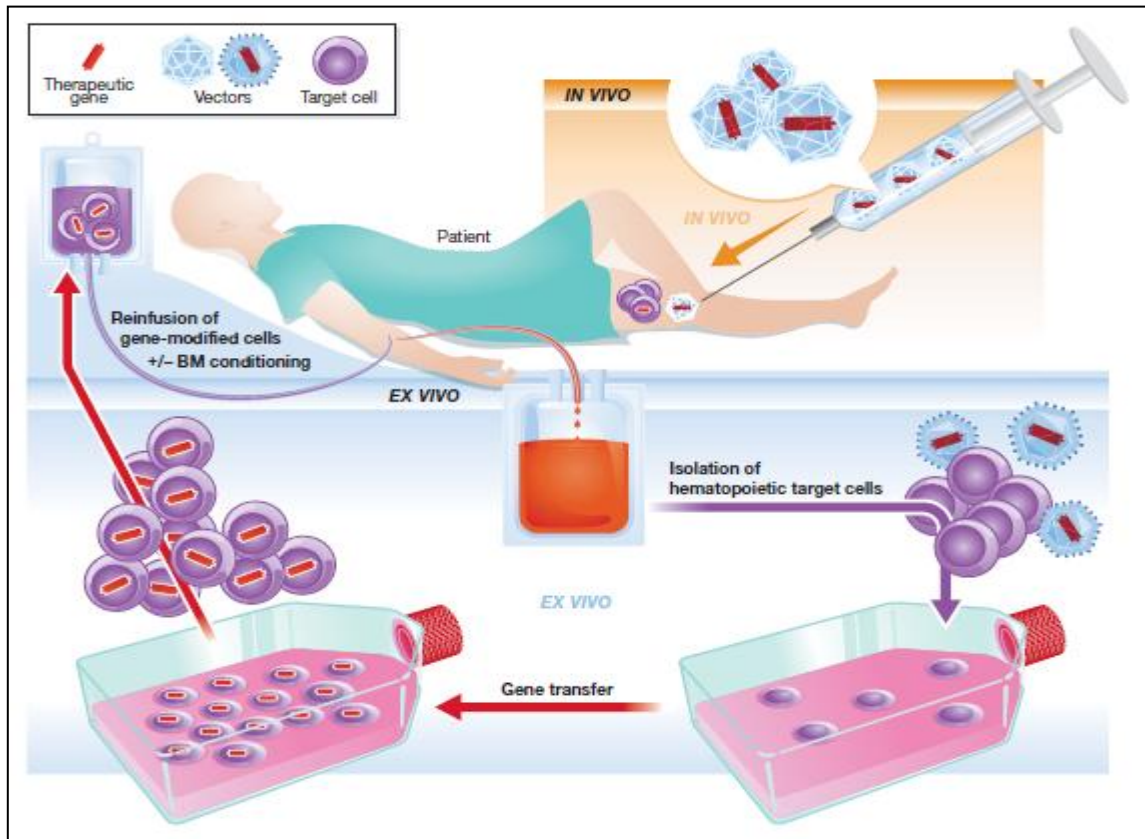
### **III. Modalités d'administration de la thérapie génique**

#### **III.1. Thérapie génique in vivo**

La thérapie génique in vivo consiste en un transfert direct de gène, soit par injection systématique dans la circulation sanguine, soit par injection locale au niveau d'un tissu ou organe (figure 4). Par exemple le transfert de gènes direct par injection au niveau de la rétine, dans les approches de thérapie génique de certaines maladies génétiques affectant la vision [19].

#### **III.2. Thérapie génique ex vivo**

La thérapie génique ex vivo consiste à recueillir des cellules de l'individu à traiter et à y introduire les bons gènes soit par transfection soit grâce à des virus (figure 4). Ces cellules, qui possèdent alors le bon gène sont réintroduites dans le sang par une injection intraveineuse. Cette stratégie ne peut être utilisée que pour des défauts génétiques se manifestant dans le sang ou localisés dans des cellules que le sang peut atteindre [15].



**Figure 4:** Concepts de thérapie génique in vivo et ex vivo [13].

### III.3. Thérapie génique in situ

La thérapie génique in situ est dite "in situ" lorsque le gène est transféré directement dans l'organisme du patient [20]. Cette technique est expérimentée, notamment, dans les cas de la mucoviscidose (transfert de vecteur dans la trachée et les bronches), de cancer (injection dans la tumeur un vecteur portant le gène d'une toxine, par exemple) [15].

### IV. Outils de transfert de gène

On distingue deux grandes familles de systèmes de vectorisation de gènes, d'un côté les vecteurs viraux et d'un autre, les vecteurs non viraux. La barrière entre ces deux familles tend à s'estomper, car on observe progressivement l'apparition de vecteurs hybrides possédant à la fois des structures virales et non virales [21]. Parallèlement à ces deux familles, il existe des méthodes physiques originales qui seront décrites de manière succincte. Ces différents vecteurs ainsi que leurs modes d'administration et les différentes méthodes physiques [22].



## **IV.1. Vecteurs de transfert de gènes**

Pour faire pénétrer l'acide nucléique à visée thérapeutique dans les cellules du patient, on utilise un vecteur. Ce sont des virus qui peuvent être modifiés dans le laboratoire pour fournir les vecteurs qui transportent l'ADN rectifié et thérapeutique dans des cellules, ou il peut être intégré dans le génome pour modifier l'expression de gène anormal et la maladie génétique corrigée. Ceci concerne à retirer l'ADN viral actuel dans le virus et le remplacer par les gènes thérapeutiques. De cette façon, le virus devient simplement un « vecteur » qui est capable de transférer le gène désiré dans des cellules [23,24]. Les vecteurs sont classés en deux types : les vecteurs viraux, les vecteurs non viraux.

### **IV.1.1. Vecteurs viraux**

Les vecteurs viraux sont les plus utilisés pour délivrer des gènes dans des organismes vivants. La délivrance de gènes par un virus est appelée transduction et les cellules infectées sont décrites comme étant transduites [25]. Pour la plupart d'entre eux, les vecteurs viraux sont plus efficaces que les non-viraux concernant le transfert du gène médicament, mais ils présentent des inconvénients liés à leur immunogénicité, leur pouvoir pathogène et la durée et le niveau d'expression du gène [26].

Les types de vecteurs sont particulièrement développés, les rétrovirus, lentivirus, les adénovirus, les virus herpes simplex et les virus adéno-associés AAV (*adeno associated viruses*) (Annexe 1).

#### **IV.1.1.1. Vecteurs rétroviraux**

Les essais initiaux de thérapie génique ont utilisé les rétrovirus comme vecteurs préférés car leur séquençage moléculaire a déjà été bien élaboré et parce qu'ils peuvent s'intégrer dans le génome de l'hôte. La famille comprend sept genres: alpha rétrovirus, beta rétrovirus, gamma rétrovirus, delta rétrovirus, epsilon rétrovirus, lentivirus (LV) et spumavirus.

Les rétrovirus thérapeutiques, dérivés habituellement d'onco-rétrovirus murins comme le virus de Moloney, sont constitués d'un seul brin d'ARN linéaire, qui possèdent une transcriptase inverse, introduisent un complexe nucléoprotéique (complexe de pré-intégration) dans le cytoplasme des cellules infectées [27]. Ce complexe fait une transcription inverse du génome viral et intègre ensuite l'ADNc obtenu dans un site unique de manière aléatoire dans le chromosome des cellules hôtes [8].

Les rétrovirus sont principalement utilisés dans des stratégies de thérapie génique ex vivo pour infecter notamment les cellules de la moelle osseuse. Les rétrovirus recombinants sont incapables d'atteindre le noyau cellulaire sans rupture de la membrane nucléaire, et ne s'intègrent donc que dans le génome des cellules en division. Le gène transféré est transmis aux cellules filles, expliquant ainsi la durée prolongée d'expression. Typiquement, le virus de la leucémie murine (MLV) a été utilisé. Cependant, l'incapacité des vecteurs rétroviraux à infecter des cellules qui ne se divisent pas a limité leur application potentielle. Puisque les rétrovirus sont capables de s'intégrer dans le génome de l'hôte, ils sont des vecteurs appropriés lorsque l'expression à long terme d'un gène étranger est nécessaire. Les principales préoccupations concernant les rétrovirus demeurent l'intégration accidentelle de ceux-ci dans le chromosome hôte, entraînant des effets délétères et potentiellement mortels [24. 28].

Le génome d'un rétrovirus (figure 5) contient trois unités de transcription : gag (fait des protéines internes), pol (fait la transcriptase inverse et quelques autres protéines), env (fait les protéines de l'enveloppe viral), plus une séquence  $\psi$  (psi) qui est reconnue par les protéines virales pour l'assemblage de l'ARN en une particule virale. Dans les vecteurs basés sur un rétrovirus gag, pol et env sont délaîtés et remplacés par le gène thérapeutique mais la séquence  $\psi$  est maintenue. La cellule d'emballage rapproche les vecteurs recombinants viraux et fournit les fonctions gag, pol et env sur des molécules séparées. La longue répétition terminal (LTR) contient les régions promoteur/activateur et les séquences impliquées dans l'intégration. Les génomes viraux recombinants sont empaquetés dans des particules virales infectantes mais incapables de se répliquer, qui bourgeonnent à partir de la cellule et sont récupérées dans le surnageant [8].



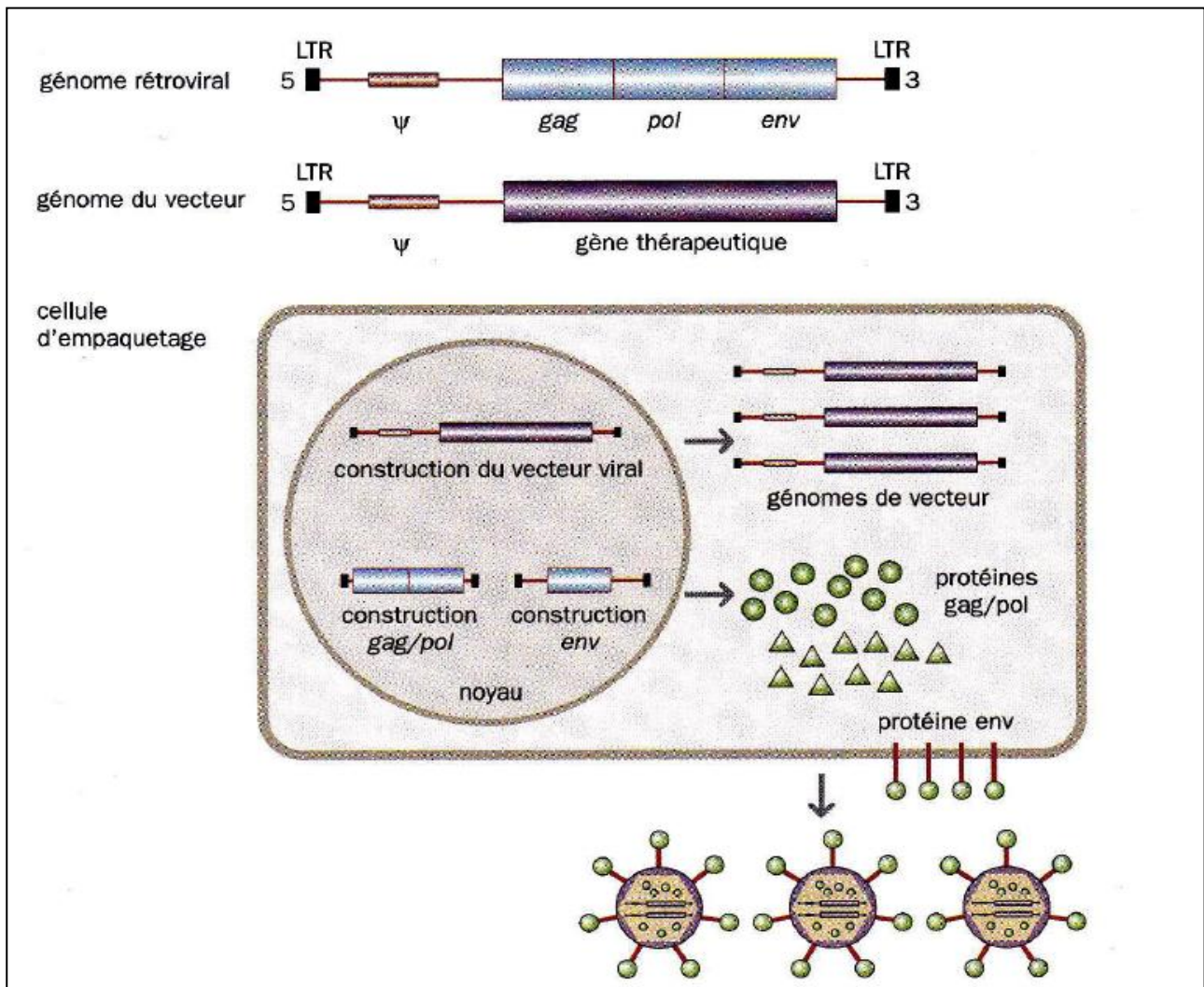
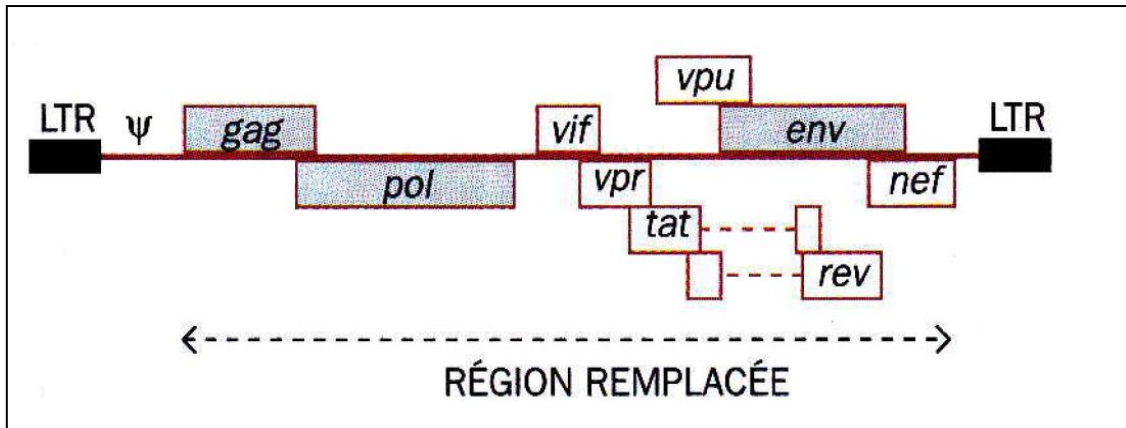


Figure 5: Vecteur rétroviraux [8].

#### IV.1.1.2. Lentivirus

Les lentivirus sont un sous-ensemble du groupe des rétrovirus. La plupart des vecteurs lentiviraux utilisés en thérapie génique sont basés sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les vecteurs du VIH peuvent s'adapter à des insertions de gène assez importantes et peuvent fournir une expression à long terme grâce à l'intégration chromosomique. Cependant, contrairement aux particules rétrovirales classiques, les vecteurs lentiviraux peuvent également délivrer des gènes étrangers à des cellules qui ne sont pas en cours de division aussi bien que des cellules en division active. Ils peuvent également être produits à des concentrations cent fois plus élevées que n'importe quel rétrovirus [28]. En plus d'un génome ARN simple brin flanqué de longue répétition terminale (LTR) et des gènes *gag*, *pol* et *env* caractéristiques, ils possèdent différents autres gènes comme *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*, qui codent les protéines impliquées dans la régulation et maturation de

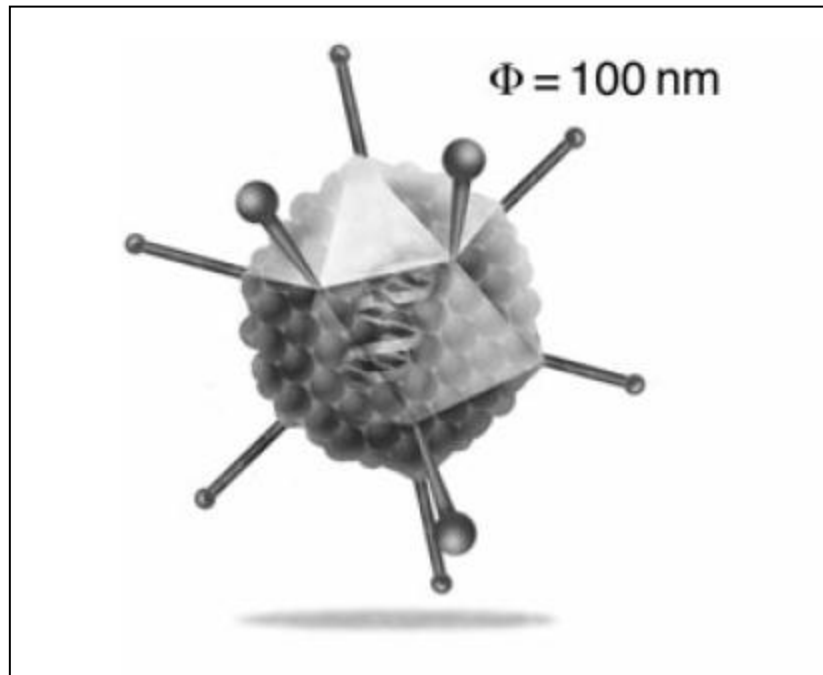
l'ARN viral et d'autres fonctions de réplication (figure 6). Dans les vecteurs recombinants, tout le génome sauf la LTR et séquence  $\psi$  peut être remplacé [8].



**Figure 6:** Vecteurs lentivirus [8].

#### IV.1.1.3. Adénovirus

Les adénovirus sont une famille de virus à ADN linéaire double brin, associé à des protéines et entouré d'une capsid (figure 7). Lorsqu'il entre dans une cellule hôte humaine par endocytose, via un récepteur, il perd sa capsid. L'ADN pénètre dans le noyau, et reste sous forme épisomale, sans s'intégrer au génome cellulaire, à la différence des rétrovirus [20]. Il existe 51 sérotypes humains d'adénovirus, groupés de A à F. Les virus A2 et A5 du sous-groupe C sont utilisés en thérapie génique et sont non-cogéniques. Les adénovirus n'affectent pas le cycle cellulaire de l'hôte et n'entraînent donc pas la mort cellulaire. De plus, puisque l'ADN viral ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte, ils ne provoquent pas de mutagenèse dans ces cellules. Les gènes d'adénovirus sont stables dans les cellules transduites, et ils ont également une grande capacité. Pour ces raisons, les adénovirus constituent une option plus intéressante pour la thérapie génique. Le virus est transformé en vecteur en supprimant les séquences responsables de la réplication de l'ADN viral. La capacité d'emballage peut être augmentée en fonction de la taille de la section enlevée [10].

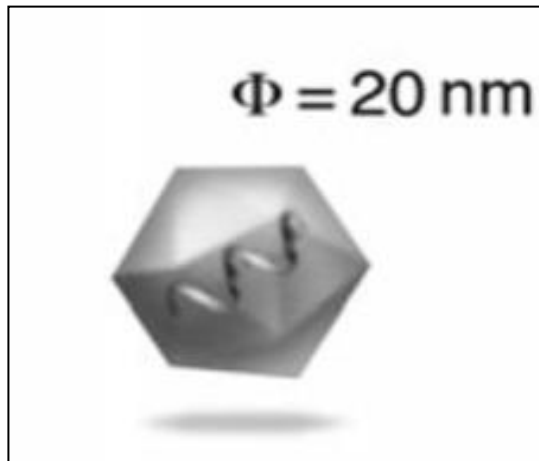


**Figure 7:** Vecteurs Adénovirus [29].

#### IV.1.1.4. Vecteurs viraux adéno-associés

Similaire à l'adénovirus, le vecteur viral adéno-associé (AAV) est l'un des systèmes de délivrance de gène les plus couramment utilisés. C'est un petit virus icosaédrique et non enveloppés à ADN simple brin et pathogène appartenant à la famille des parvoviridae, en particulier le genre dépendovirus. Il peut s'intégrer en un site spécifique du chromosome 19 du génome humain. L'infection efficace par un virus adéno-associé nécessite des protéines fournis par un autre virus (helper virus, virus assistant ou auxiliaire) tel qu'un adénovirus, d'où le nom de virus adéno-associé. Après l'entrée de ce virus adéno-associé dans le noyau, les polymérases d'une cellule hôte convertissent le génome du virus adéno-associé en un ADN double brin, qui est ensuite transcrit [31]. L'AAV exprime efficacement l'ADN transgénique dans divers types cellulaires dans de nombreux tissus. Les inconvénients de l'AAV sont doubles, l'une est sa capacité d'emballage restreinte et la seconde est sa capacité de production à grande échelle inefficace. En outre, AAV a besoin d'un virus auxiliaire pour la réplication virale productive. En l'absence d'un virus auxiliaire.

Les AAV établissent une infection latente dans la cellule, soit par intégration spécifique au site dans le génome de l'hôte, soit par persistance dans les formes épisomales. En outre, l'immunité préexistante aux vecteurs AAV humains est comparable à l'adénovirus [30].



**Figure 8:** Vecteurs adéno-associés [29].

#### **IV.1.1.5. Virus de l'herpès simplex**

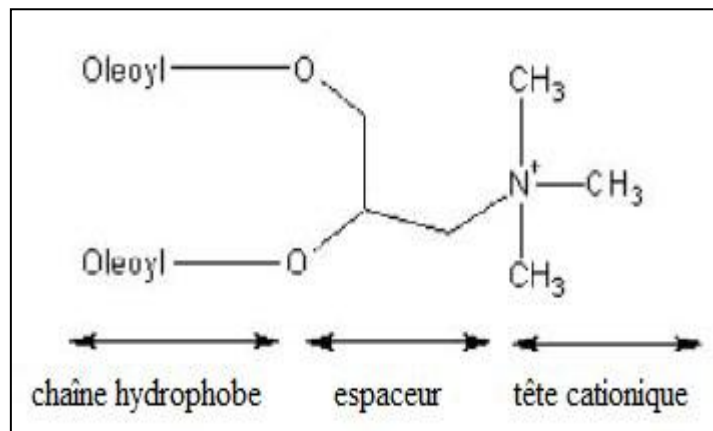
Les virus de l'herpès simplex appartiennent à la famille des herpèsviridés. Ils ont une taille de génome relativement importante, démontrent un neurotropisme et présentent une phase latente dans leur cycle de vie, ce qui permet à leur génome de rester épisomique dans le noyau de la cellule pour la durée de vie de l'hôte. Les caractéristiques des virus de l'herpès simplex comprennent leur capacité à atteindre des titres élevés, leur capacité à infecter des cellules qui ne se divisent pas et leur capacité à emballer avec succès de grands inserts exogènes. Cependant, lors de l'utilisation de vecteurs viraux herpès simplex, il est difficile d'éliminer complètement l'expression génique virale lytique, la cytotoxicité induite par le vecteur et l'expression génique transitoire limitant leur utilité pour une utilisation en thérapie génique [20. 32].

#### **IV.1.2. Vecteurs synthétique**

Les vecteurs synthétiques représentent une alternative prometteuse aux vecteurs viraux. Ils sont simples à élaborer, à utiliser et sont peu immunogènes. Cependant, leur grand handicap réside dans leur plus faible efficacité. Ce sont des dérivés cationiques, de nature lipidique ou polymérique. Ces vecteurs sont capables d'interagir par effet électrostatique avec les phosphates anioniques de l'ADN, et de le compacter pour engendrer des particules appelées lipoplexes ou polyplexes [33].

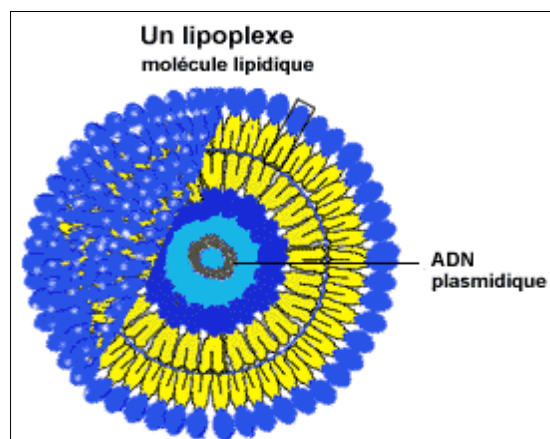
##### **IV.1.2.1. Lipides cationiques**

Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles qui présentent généralement trois parties: une tête cationique permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes, et un espaceur séparant ces deux éléments (Figure 9) [35].



**Figure 9:** Représentation schématique d'un lipide cationique [34].

L'efficacité de la transfection des lipides cationiques varie considérablement en fonction de la structure des lipides cationiques (forme géométrique globale, nombre de groupes chargés par molécule, nature de l'ancrage lipidique et liaison des lieux), rapport de charge utilisé pour former les complexes ADN-lipides, et les propriétés du colipide. Lorsqu'ils sont mélangés avec l'ADN chargé négativement, les liposomes chargés positivement forment spontanément des structures compactées appelées lipoplexes (figure 10) [35].



**Figure 10:** Structure de lipoplexe [36].

Dans la structure lipoplex, les molécules d'ADN sont entourées par des lipides chargés positivement qui leur confèrent une protection contre les nucléases extracellulaires ou

intracellulaires. En outre, les lipoplexes, en raison de leurs charges positives, ont tendance à interagir électrostatiquement avec les molécules chargées négativement de la membrane cellulaire (glycoprotéines et protéoglycanes) qui peuvent faciliter leur absorption cellulaire [37].

#### **IV.1.2.2. Polymères cationiques**

Les polymères cationiques ont également été largement utilisés pour le transfert de gènes. Lors du mélange avec l'ADN, ces polymères forment des complexes nanométriques, souvent appelés polyplexes. Parmi les polymères cationiques, le PEI (Polyéthylénimine) est considéré comme l'un des agents de transfection à base de polymère les plus efficaces.

L'efficacité de la transfection et la toxicité de la PEI dépendent de son poids moléculaire (PM), de sa configuration et du taux de charge du polymère par rapport à l'ADN utilisé. Plusieurs études ont montré que les PEI à haute PM (supérieure à 25 000 Da) sont toxiques pour les cellules alors que les polymères à PM moyen (5 000-25 000 Da) sont plus efficaces et moins toxiques. Les polyplexes entre l'ADN et la PEI linéaire sont actifs *in vivo* lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse.

D'autres polymères tels que les dendromères, les chitosanes, les dérivés aminés synthétiques du dextrane et les polymères acryliques cationiques se sont révélés posséder des niveaux significatifs d'activité de transfert de gènes [37].

#### **A. Chitosane**

Le chitosane est un polymère polycationique biodégradable non toxique à faible immunogénicité. C'est un bon candidat pour le système de livraison de gène parce que le chitosane chargé positivement et donc peut être complexé avec ADN chargé négativement [38].

#### **B. Dendrimères**

Un dendrimère est une macromolécule fortement ramifiée avec une forme sphérique. En présence de matériel génétique, la complémentarité des charges conduit à une association temporaire de l'acide nucléique avec le cationique dendrimère qui est ensuite pris dans la cellule via l'endocytose [39].

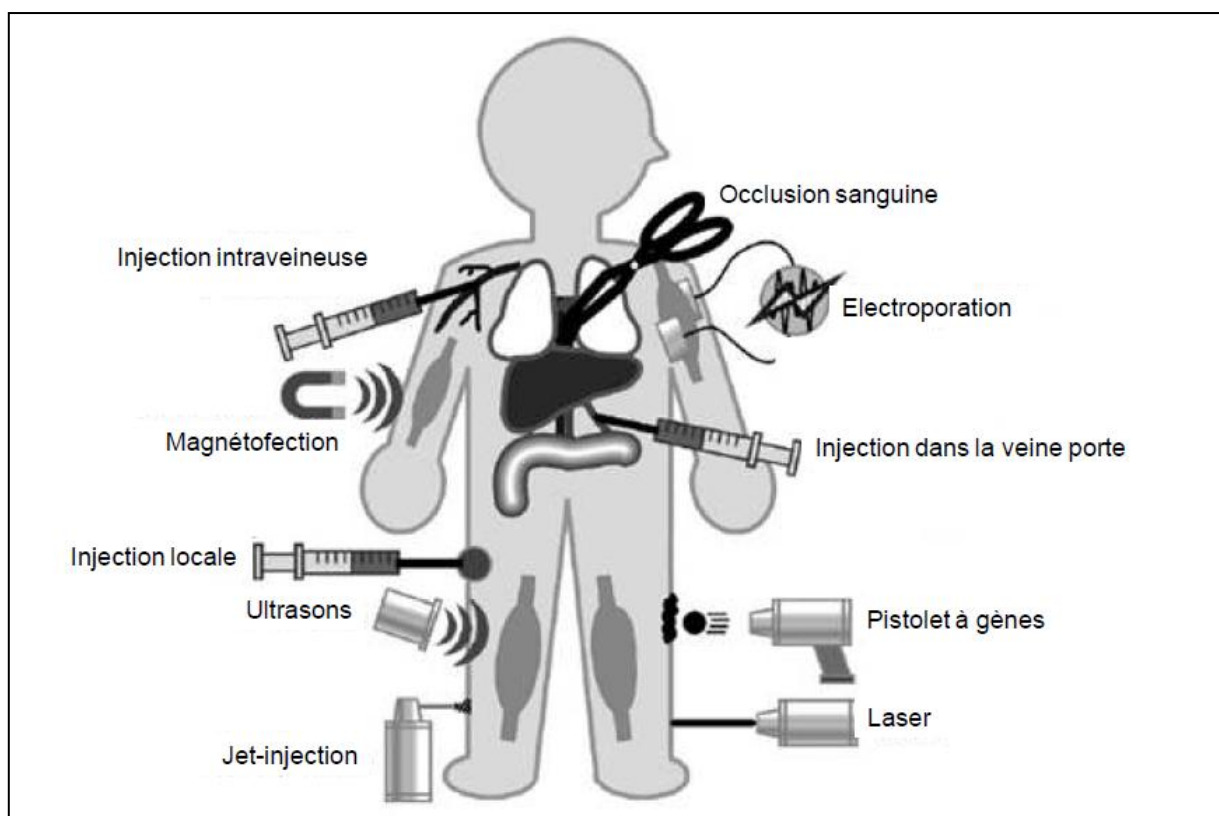


## C. Polyméthacrylate

Est un polymère à base de vinyle capable de condenser les polynucléotides en particules de taille nanométrique. Mais la transfection est limitée en raison de leur faible capacité à interagir avec les membranes [40].

## IV.2. Méthodes physiques

Les méthodes physiques appliquées pour la délivrance de gènes *in vitro* et *in vivo* sont basées sur la réalisation d'une pénétration transitoire dans les cellules [39]. Ces méthodes emploient des champs électriques (électroporation), acoustiques (sonoporation), magnétique (magnétofection) ou photonique (laser) pour déstabiliser les membranes cellulaires de façon transitoire. Dans ces techniques, l'acide nucléique à transférer n'est pas condensé (figure 11) [42].



**Figure 11:** Principales méthodes physiques du transfert de gènes [43].

### IV.2.1. ADN nu

ADN nu est le système de délivrance de gène non viral le plus simple, il est le seul qui est capable de transférer un gène dans la peau, le thymus, le muscle cardiaque et en particulier le muscle squelettique et les cellules hépatiques, lorsqu'elles sont directement injectées, elles ont également été appliquées directement. Bien que l'injection d'ADN nu soit une méthode sûre et simple, son efficacité pour la livraison de gènes est faible, donc il est seulement approprié pour certaines applications, telles que des essais cliniques de vaccination par l'ADN visant à injecter des plasmides d'ADN nus ont été réalisés avec succès. L'expression a été très faible par rapport à d'autres méthodes de transfection [44].

#### **IV.2.2. Pistolets géniques**

L'administration de pistolets géniques, également appelée transfert d'ADN biolistique ou bombardement de particules recouvertes d'ADN, a été utilisée pour la première fois en 1987 pour le transfert de gènes dans des plantes [37].

Est une technique qui permet de transférer des plasmides dans les cellules et les tissus. Il est nécessaire d'absorber le plasmide sur des particules d'or ou de tungstène (1-3  $\mu\text{m}$  de diamètre). L'injection sous haute pression des particules a permis une amélioration de la délivrance des plasmides. En effet, ce système permet de transférer le tissu sous cutané et les muscles. Cette méthode a été également exploitée pour le transfert de gène dans la rétine et dans la sphère urogénitale [42].

#### **IV.2.3. Électroporation**

Électrolocation est la déstabilisation temporaire du tissu ciblé de la membrane cellulaire par l'insertion d'une paire d'électrodes dans le milieu afin que les molécules d'ADN dans les milieux environnants de la membrane déstabilisée soient en mesure de pénétrer dans le cytoplasme et le nucléoplasme de la cellule, mais malheureusement, le transgène ne peut s'intégrer qu'à 0,01% des cellules traitées. Un taux élevé de mort cellulaire suite à l'électroporation a limité son utilisation [39].

#### **IV.2.4. Magnétofection**

La technique est basée sur le couplage d'un gène thérapeutique à une nanoparticule magnétique. Ce complexe est introduit dans la culture cellulaire. Cette technique est principalement



utilisée dans la recherche *in vitro* pour la transfection de cellules primaires et de cellules difficiles à transférer par d'autres moyens [40].

#### **IV.2.5. Ultrason**

L'échographie peut faire des pores nanométriques dans la membrane pour faciliter la livraison intracellulaire de particules d'ADN dans les cellules des organes internes ou des tumeurs, de sorte que la taille et la concentration de l'ADN plasmidique jouent un rôle important dans l'efficacité du système. Le système est peu efficace, notamment *in vivo* [44].

#### **IV.2.6. Hydrodynamique**

Hydrodynamique est une méthode simple et très efficace pour la livraison intracellulaire directe de tous les composés hydrosolubles et les particules dans les organes internes. L'efficacité de cette méthode simple *in vivo* est plus élevée que tout autre système non viral [44].

# Partie II

## **Application de la thérapie génique**

Les maladies génétiques, congénitales et héréditaires sont les maladies pour lesquelles la thérapie génique a été initialement créée. La thérapie génique reste la plupart du temps la meilleure alternative thérapeutique pour ces maladies.

Permet les maladies génétiques l'hémophilie et la dystrophie musculaires de Duchenne (DMD) qui sont des maladies cibles idéales de la thérapie génique [45].

## **I. Hémophilie A**

### **I.1. Maladie**

#### **I.1.1. Définition**

L'hémophilie est un trouble hémorragique génétiquement héréditaire rare causé par une déficience des facteurs de coagulation fonctionnels : facteur antihémophilique FVIII (hémophilie A) ou FIX (hémophilie B) dans le plasma sanguin, empêche la coagulation du sang, causant des saignements anormalement longs en cas de blessure et parfois en l'absence de blessure, qui se caractérise par des saignements spontanés et prolongés dans les articulations, les muscles et les organes internes.

L'hémophilie A (HA), également appelée «hémophilie classique» est la plus courante et représente 80 à 85% des patients hémophiles qui touche environ 1 naissance sur 5 000 enfants de sexe masculin [46- 48].

#### **I.1.2. Classification**

La classification et la gravité de l'hémophilie ont été basées sur les taux circulants et l'activité résiduelle des facteurs de coagulation dans le plasma. On distingue trois degrés de sévérité de l'hémophilie, en fonction du taux de facteur VIII :

- sévère : (50% des cas) : taux < 1 %, hémorragies spontanés, graves et fréquentes (hebdomadaires), principalement au niveau des articulations et des muscles ;
- modérée: (10 à 20% des cas) : taux compris entre 1 et 5 %, peut présenter des saignements spontanés occasionnels, saignements graves en cas de traumatisme ou d'intervention chirurgicale ;

- légère: (30 à 40% des cas) : taux d'activité du facteur de coagulation compris entre 5 et 30 %, peut rester infra-clinique, risque hémorragique faible seulement après blessure ou chirurgie [49].

### I.1.3. Symptômes

Les symptômes dépendent de l'importance du déficit. Chez les personnes avec un déficit sévère ou modéré, des hémorragies surviennent typiquement aux localisations suivantes:

- articulations (= hémarthroses), avant tout au niveau des genoux, des chevilles et des coudes;
- muscles, par exemple psoas et cuisse;
- organes internes: appareil uro-génital, système gastro-intestinal, cerveau, etc. [50].

La fréquence des épisodes hémorragiques sont liés au niveau d'activité de coagulation du facteur VIII :

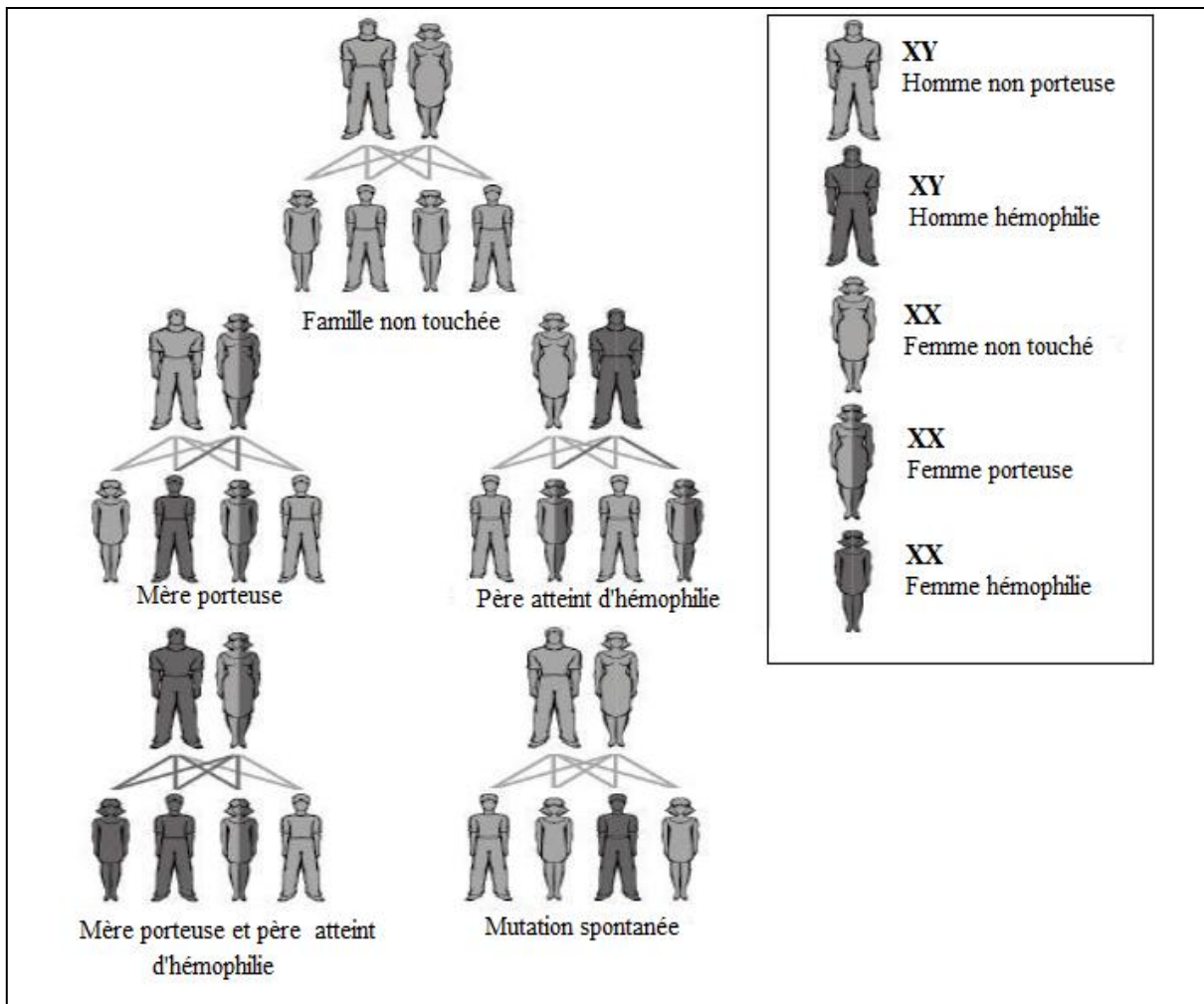
- **L'hémophilie sévère** : est caractérisée par des hémarthroses et des hématomes sous-cutanés fréquents. Les épisodes de saignement surviennent une ou deux fois par semaine ; ils sont souvent d'apparence spontanée.
- **L'hémophilie modérée** : est associée à des hémorragies résultant habituellement d'un traumatisme léger (épisodes de saignement environ une fois par mois). Les hémorragies spontanées sont rares.
- **L'hémophilie légère** : peut passer inaperçue. Des problèmes de coagulation sont observés seulement dans le cas de blessures graves. Il existe néanmoins un risque de saignement prolongé en cas d'intervention chirurgicale ou d'extraction dentaire. Il n'y a pas d'hémorragies spontanées. Les symptômes étant plus insidieux, les patients doivent être éduqués et informés des signes d'alerte [51].

### I.1.4. Transmission

L'hémophilie est causée par des perturbations ou des changements (mutations) du gène F8 situé sur le chromosome X. Environ 70% des cas sont hérités comme un caractère récessif lié à l'X. Dans les 30% restants, les cas surviennent spontanément (c'est-à-dire une nouvelle mutation) sans antécédents familiaux de trouble [52].

Le gène responsable est lié au chromosome X, comme l'autre chromosome sexuel (chromosome Y) ne contient pas le segment d'ADN qui programme la fabrication des facteurs de coagulation, la capacité de synthèse dépendra entièrement du chromosome X [53].

Généralement, les femmes n'expriment pas les troubles, parce que le gène normal situé sur un chromosome X domine le gène anormal situé sur le deuxième chromosome X. Pour que la tare s'exprime, la fille doit être homozygote, c'est-à-dire que ses deux chromosomes X doivent porter le gène de l'hémophilie  $X^hX^h$ . Cette possibilité existe, mais en pratique l'anomalie est exceptionnelle parce qu'elle est létale. Pour les mâles, puisqu'il n'y a qu'un seul chromosome X, il n'y aura que deux possibilités: Soit le gène correspondant est normal, le mâle est sain  $X^HY$ , soit le gène est anormal le mâle est hémophile  $X^hY$  et rien n'empêchera alors la maladie de s'exprimer (figure 12) [53. 54].

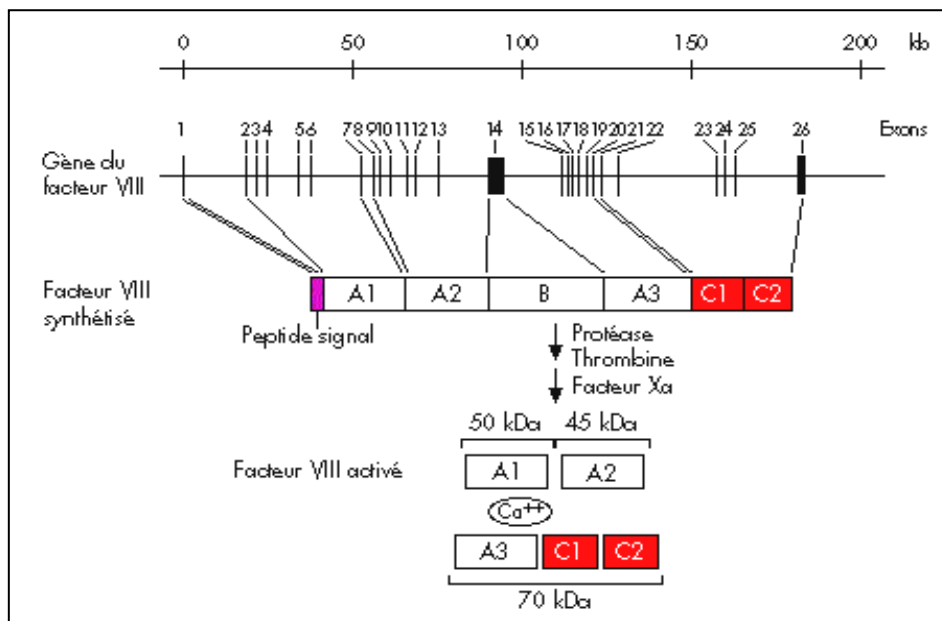


**Figure 12:** Mode de transmission de l'hémophilie A [55].

### I.1.5. Facteur VIII

Les facteurs de coagulation sont des glycoprotéines de 280 KDa spécialisées qui circule dans le sang à ~ 200 ng / ml sont essentielles pour une coagulation adéquate, le processus par lequel le sang s'agglomère pour boucher le site d'une plaie afin d'arrêter le saignement [49].

Le gène F8 qui code pour le facteur VIII se situe sur le bras long du chromosome X en région Xq28. Le facteur VIII est composé de deux chaînes : une chaîne lourde formée par les domaines A1-A2-B et une chaîne légère formée par les domaines A3-C1-C2 (Figure 13). Le rôle du domaine B est peu connu, mais il a été prouvé que sa délétion ne modifiait pas l'activité du facteur VIII. Dans la cascade de la coagulation, le facteur VIII est clivé par la thrombine en une forme active composée de trois sous-unités : A1, A2 et A3-C1-C2, appelée fVIIIa (facteur VIII activé). Dans la circulation sanguine, le facteur VIII est stabilisé par le Facteur de von Willebrand (FvW) et a une demi-vie courte (12h) [48. 49].



**Figure 13:** Le facteur VIII [56].

### I.2. Modèles animaux

Il existe de nombreux modèles animaux disponibles pour étudier l'hémophilie A (figure 14) :

Models	Mouse	NHP	Dog	Sheep	Human
Hemophilia A	+	-	+	+	+
Hemophilia B	+	-	+	-	+
Weight	25 g	6-8 kg	10-40 kg	45-160 kg	60-90 kg
AAV dose ( $2 \times 10^{12}$ vg/kg)	$5 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^{13}$	$6 \times 10^{13}$	$1.2 \times 10^{14}$	$1.5 \times 10^{14}$

**Figure 14 :** Modèles animaux de l'hémophilie [57].

### I.2.1. Souris

Les souris sont des animaux populaires pour la recherche médicale et les tests précliniques dans le monde entier [58].

Les modèles de souris hémophiles n'étaient pas disponibles avant les années 1990. Le Dr Haig Kazazian et ses collègues ont produit des souris présentant un déficit en FVIII en utilisant des techniques de ciblage génique standard pour établir le premier modèle murin d'hémophilie [59].

Après isolement d'un clone génomique contenant les exons 15 à 22 du gène F8, deux cassettes de néomycine séparées ont été utilisées pour générer les souris hémophiles A, l'une ciblant l'exon 16 et l'autre ciblant l'exon 17 (les deux dans le domaine A3 de la chaîne légère). Les souris knockout de l'exon 16 ont été générées par insertion de la cassette de néomycine dans l'extrémité 3' de cet exon provoquant un épissage anormal de l'ARN. Les souris knockout de l'exon 17 ont la cassette de néomycine insérée dans l'extrémité 5' de l'exon 17 qui conduit au saut d'exon. Des mutations dans ces deux exons provoquent l'hémophilie A avec un phénotype sévère (<1% d'activité résiduelle du FVIII) [59].

Contrairement à l'hémophilie A humaine, peu de saignements spontanés sont observés dans les modèles murins d'hémophilie A, alors que les coupures de la queue ou d'autres interventions invasives peuvent entraîner la mort [58].

### I.2.2. Chiens

Les chiens atteints d'hémophilie A naturelle ont d'abord été documentés à la suite d'observations de saignement anormalement prolongés qui pourraient être traités ou prévenus par perfusion de FVIII canin. Deux colonies de chiens atteints d'hémophilie A sont le plus souvent utilisées dans les études: une colonie Irlandaise Setter à l'Université de Caroline du Nord à Chapel Hill et une colonie de Schnauzer miniature à l'Université Queens à Toronto (Canada). Les deux colonies sont déficientes en FVIII circulant et montrent une mutation d'inversion aberrante entre ~ 0,5 Mb en amont du gène F8 et son intron 22. En plus de l'inversion par l'intron 22 du gène F8, les chiens atteints d'hémophilie A ont également été décrits comme ayant d'autres mutations spontanées dans le gène F8 [60].

Les chiens hémophiles A ont été largement utilisés dans des essais précliniques sur des protéines FVIII humaines ainsi que dans des études sur l'innocuité et l'efficacité d'une thérapie génique virale adéno-associée, pour tester la thérapie génique des plaquettes [60].

### **I.2.3. Nouveaux modèles**

#### **I.2.3.1. Mouton**

Des phénotypes compatibles avec l'hémophilie A humaine, y compris des saignements spontanés et une activité plasmatique du FVIII inférieure à 1%, ont été observés chez les moutons [58].

Les moutons hémophiles ont été utilisés dans des études sur les thérapies géniques et cellulaires, notamment sur l'immunité préexistante aux vecteurs AAV et l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses comme vecteurs du gène F8. Cependant, la disponibilité restreinte du FVIII ovin recombinant pour le traitement peut limiter l'utilisation pratique du mouton hémophile [58.60].

#### **II.3.3.2. Cochon**

Les porcs atteints d'hémophilie A ont été générés par transfert nucléaire et clonage à partir de fibroblastes fœtaux porcins portant la perturbation de l'exon 16 du gène F8 porcine par le gène résistant à la néomycine. Les cochons sont d'excellents modèles biomédicaux de maladies humaines. Le système de coagulation du sang porcine est très similaire à celui de l'homme, en raison de la forte homologie entre les séquences d'acides aminés du facteur de coagulation. De plus, le FVIII porcine a été utilisé pour traiter l'hémophilie A avec des inhibiteurs du FVIII. Par conséquent,



le porc hémophile A pourrait être un bon modèle animal pour étudier les médicaments de nouvelle génération pour l'hémophilie A [61].

### **II.3.3.3. Rats**

Les chercheurs ont identifié une souche de rat WAG / RijY consanguine, appelée WAG / RijYcb, qui présentait une hémorragie anormale, un temps de thromboplastine partielle activée prolongée et un gène F8 muté (la proline était substituée à la leucine à l'acide aminé 176 dans le domaine A1). Chez les rats, le gène F8 est localisé sur le chromosome 18. Ainsi, l'hémophilie chez le rat est autosomique récessive, ce qui contraste avec les humains et d'autres modèles animaux où il s'agit d'une maladie héréditaire liée à X [58].

Le modèle du rat sera expérimentalement avantageux car il permettra de recueillir un plus grand volume de plasma pour l'analyse que ce qui peut être recueilli chez la souris et permettra des capacités de reproduction similaires à celles des souris. Ce nouveau modèle trouvera probablement un créneau intéressant parmi les modèles animaux de l'hémophilie A utilisés pour la recherche transrationnelle [59].

### **I.3. Utilisation de la thérapie génique**

La thérapie génique est une approche alternative intéressante au traitement de l'hémophilie qui idéalement apporterait une correction à vie de l'activité de coagulation en une seule injection.

Les principales difficultés en thérapie génique pour l'hémophilie A proviennent du fait que FVIII est une protéine beaucoup plus compliquée que le facteur IX. Contrairement au domaine unique de FIX, FVIII est produit sous la forme d'une protéine de 2351 acides aminés (codée par un ADNc de 9 kb) qui après sécrétion est clivée en un hétérodimère non covalent de deux chaînes: la chaîne lourde (domaines A1-A2-B) et la chaîne légère (domaines A3-C1-C2). La taille et la complexité du FVIII entraînent plusieurs complications pour la thérapie génique [57]. Cette structure peut se dissocier, entraînant la formation de chaînes FVIII dissociées inactivées [48].

Le premier essai de thérapie génique pour le déficit en FVIII impliquait une thérapie génique non virale de cellules somatiques utilisant des fibroblastes autologues (obtenus à partir d'une biopsie cutanée) transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc de FVIII pour le domaine B délété. Les cellules en culture qui ont exprimé des niveaux élevés de FVIII ont été sélectionnées, élargies, caractérisées et ensuite implantées dans l'épiploon sur plusieurs sites en utilisant la laparoscopie.

Bien que des taux de FVIII de 1 à 5 U / dL aient été observés après l'implantation du fibroblaste transfecté, aucun des sujets n'avait présenté de taux plasmatiques de FVIII > 0,5 U / dL à 12 mois. Il y a eu une certaine diminution de l'utilisation des produits de remplacement du FVIII, mais d'autres études n'ont pas été rapportées [62].

### **I.3.1. Premiers essais cliniques**

#### **I.3.1.1. Rétrovirus simples**

Le premier vecteur utilisé en thérapie génique pour l'hémophilie A est un rétrovirus simple : le virus de la leucémie murine de Moloney dont l'efficacité in vitro à transporter et à insérer le transgène du facteur VIII à des cellules [63].

Les virus de la leucémie murine de Moloney (MoMLV) sont les plus couramment utilisés pour les essais cliniques et offrent le potentiel de l'expression génique à long terme en vertu de leur stable intégration chromosomique et l'absence d'expression génique virale. Leur intégration permet le passage du transgène à toutes les cellules de la progéniture [64].

La première démonstration préclinique de thérapie génique rétrovirale ex vivo pour l'hémophilie A été réalisée par transplantation de fibroblastes dermiques humains génétiquement modifiés ensemencés sur des fibres artificielles revêtues de collagène dans la cavité péritonéale de souris immunodéficientes. Une expression de haut niveau, mais transitoire, du FVIII humain BDD (B-Domain-Deleted) a été observée. La perte d'expression était probablement due à la mort cellulaire dans le néo-organe implanté [63].

D'autres types cellulaires ont été utilisés, en particulier les cellules de la moelle osseuse. La greffe de la moelle osseuse est une technique éprouvée et ces cellules sont en contact direct avec la circulation sanguine. Alors que les cellules de la lignée hématopoïétique n'expriment qu'une faible quantité du facteur VIII, les cellules mésenchymateuses sont capables d'en produire une quantité thérapeutique. Des études in vitro ont montré une concentration égale à 30ng/ml ce qui est suffisant pour passer d'un phénotype de HA sévère à un phénotype de HA bénigne. Cependant, aucun essai in vivo n'a eu de résultat durable ce qui a été imputé à une probable inhibition de l'expression du transgène [63].

#### **I.3.1.2. Adénovirus**

De tous les vecteurs actuellement en essais cliniques, les adénovirus sont les vecteurs les plus efficaces pour le transfert direct du gène *in vivo*. Ils infectent les cellules cibles par des interactions avec les récepteurs de la surface cellulaire adénovirus, suivies par une internalisation endosomale et une translocation nucléaire où le génome viral reste épisomique. Pour la thérapie génique, une partie du génome viral (de taille variable) nécessaire à la réplication virale est supprimée et remplacée par une cassette transgénique. Les vecteurs adénoviraux infectent efficacement de nombreux types cellulaires, y compris les cellules non diviseuses telles que les hépatocytes, et favorisent l'expression transgénique de haut niveau, ce qui génère un enthousiasme pour leur utilisation dans des applications de thérapie génique. Cependant, les vecteurs adénoviraux stimulent également le système immunitaire, qui a des effets secondaires néfastes, y compris une hépatotoxicité et des réponses inflammatoires aiguës, qui limitent la dose qui peut être administrée de manière sûre [64].

Les principaux avantages des vecteurs adénoviraux sont leur large gamme d'hôtes et leur capacité à transduire des cellules non divisantes, contrairement aux vecteurs rétrovirus MoMLV. Et l'inconvénient de vecteurs adénovirus est que la réponse immunitaire de l'hôte, en général, semble limiter la durée de l'expression du transgène et la capacité de réadministrer le vecteur. En outre, des effets toxiques et létaux sont fréquemment observés chez les primates non humains et d'autres animaux, y compris les souris et les lapins, recevant de fortes doses de vecteurs adénoviraux à réplication déficiente. Enfin, quelques essais cliniques basés sur des vecteurs adénoviraux ont été interrompus en raison de l'inflammation aiguë chez certains patients. Néanmoins, des doses plus faibles de vecteurs améliorés pourraient atteindre des niveaux d'expression similaires tout en réduisant leurs effets cytopathiques et hépatotoxiques [64].

### **I.3.2. Nouveaux vecteurs**

#### **I.3.2.1. Virus adéno-associé(AAV)**

Étant donné le succès de l'AAV en tant que vecteur pour le traitement de l'hémophilie B, il est logique qu'un certain nombre d'approches aient tenté de l'utiliser pour l'hémophilie A [65].

Il existe deux différences majeures du point de vue de la thérapie génique. Le premier est la capacité d'emballage limitée de l'AAV pour le grand ADN complémentaire du FVIII et le second est le risque élevé de réponses immunitaires au néotransgène qui est anticipé avec la thérapie à base de protéines et potentiellement avec tout nouveau traitement contre l'hémophilie A [66].

Une étude systématique chez les chiens HA en délivrant un transgène FVIII canine (cFVIII) soit en tant que chaîne unique ou deux chaînes dans un vecteur AAV. Une chaîne unique de cFVIII optimisée administrée à l'aide du sérotype 8 d'AAV (AAV8) par injection veineuse périphérique a entraîné une réponse-dose avec une expression prolongée de FVIII jusqu'à 7%. Les chiens HA administrés à deux chaînes en utilisant AAV8 ou AAV9 via la veine porte ont exprimé à long terme, les niveaux dose-dépendants du vecteur de l'activité du FVIII. Dans l'approche à deux chaînes, les taux circulants d'antigène cFVIII étaient plus de cinq fois plus élevés que l'activité. Notamment, aucune réponse immunitaire à long terme au FVIII n'a été observée chez aucun des chiens. Le suivi à long terme des chiens a montré une réduction remarquable (> 90%) des épisodes hémorragiques dans un total combiné de 24 années d'observation. Ces données démontrent que les deux approches sont sécuritaires et atteignent des niveaux thérapeutiques d'expression du FVIII dépendant de la dose, ce qui soutient les études translationnelles de l'administration par AAV de l'HA. Efficacité et innocuité de la prophylaxie à long terme chez les chiens atteints d'hémophilie grave à la suite d'une thérapie génique du foie utilisant des vecteurs AAV [65. 66].

On peut conclure que les AAV sont des vecteurs prometteurs pour le traitement de l'hémophilie A. Cependant, le facteur VIII canin est plus stable et a une activité supérieure au facteur VIII humain. Et les essais cliniques précédents ont montré que les humains ont une réaction immunitaire plus forte que les autres espèces. Il reste donc encore de nombreuses recherches à effectuer, principalement sur la sécurité et l'efficacité du vecteur et du transgène humain, avant qu'un essai clinique ne soit accepté [16].

### **I.3.2.2. Utilisation des lentivirus**

Les lentivirus sont capables de transfecter les cellules quiescentes (comme les hépatocytes) et d'intégrer leur génome dans l'ADN de la cellule cible (ce qui permet une expression à long terme), loin des promoteurs, réduisant ainsi le risque de mutation par insertion. Ils sont aussi capables de transporter des séquences de 8 kb. Ces caractéristiques en font des candidats pour la thérapie génique de l'hémophilie A [16].

Une séquence WPRE (woodchuck post-transcriptional regulatory element) est régulièrement insérée après le transgène afin d'augmenter son expression lors de l'utilisation de lentivirus (de 2 à 5 fois plus que sans le WPRE). Cette augmentation est due à une augmentation de l'exportation des ARNm et potentiellement à une facilitation de la transcription. Cependant, l'action du WPRE dépend à la fois du type cellulaire transfecté et du promoteur utilisé. De fait, dans certaines

conditions, l'adjonction du WPRE peut diminuer l'expression du transgène. De plus, le WPRE code pour les soixante premiers acides aminés d'un oncogène. Son utilisation est donc remise en question. Johnston et son équipe ont montré (2013) que dans le cas particuliers de l'hémophilie A (utilisation de deux systèmes à base de lentivirus) le WPRE n'a aucune influence sur l'expression du transgène HP-FVIII. Dans cette étude, le système le plus efficace, qui a permis la sécrétion par les souris traitées d'une quantité thérapeutique de FVIII, est un système utilisant un vecteur produit à partir d'un virus de l'immunodéficience simienne avec le promoteur du cytomégalovirus (CMV) et le transgène HP-FVIII [16].

### **I.3.2.3. Utilisation de vecteurs non viraux**

La recherche sur la thérapie génique non virale pour l'hémophilie A largement reflété les approches utilisées pour l'hémophilie B. L'injection hydrodynamique *in vivo* du plasmide exprimant FVIII peut induire l'expression du transgène [57].

L'injection hydrodynamique en conjonction avec le trans-épissage de l'ARN (ARN thérapeutique d'épissage dans l'ARNm riche en albumine) a également été explorée dans le traitement de l'hémophilie A. En plus de l'injection hydrodynamique, les plasmides exprimant FVIII ont également été ciblés sur des types cellulaires spécifiques en utilisant des nanocapsules [57].

Le transfert de gène non viral a également été utilisé *ex vivo* pour le traitement de l'hémophilie A. Chez des patients humains, cette approche *ex vivo* a été utilisée pour transduire des fibroblastes dermiques autologues et sélectionner des cellules productrices de FVIII. L'administration de ces fibroblastes génétiquement modifiés à des patients hémophiles A provoqué une légère diminution du nombre d'événements hémorragiques et aucune formation d'inhibiteur n'a été détectée. Compte tenu de ces résultats prometteurs, des études ultérieures sont concentrées sur la recherche d'un type cellulaire supérieur pour la transduction *ex vivo*, les cellules endothéliales de l'excroissance du sang (BOEC) se sont révélées prometteuses pour cette approche. Ces cellules, dérivées de cellules endothéliales circulantes dans le sang périphérique, présentent de nombreuses caractéristiques des cellules endothéliales. Après le transfert de gènes, la sélection et l'injection chez la souris, les BOEC génétiquement modifiés ont induit des taux circulants, en fonction de la dose cellulaire. Ces cellules maintenaient un phénotype endothélial et s'accumulaient principalement dans la rate et la moelle osseuse. D'autres études ont également permis d'obtenir un ensemencement persistant du foie et des poumons en plus de la rate et de la moelle osseuse [57].

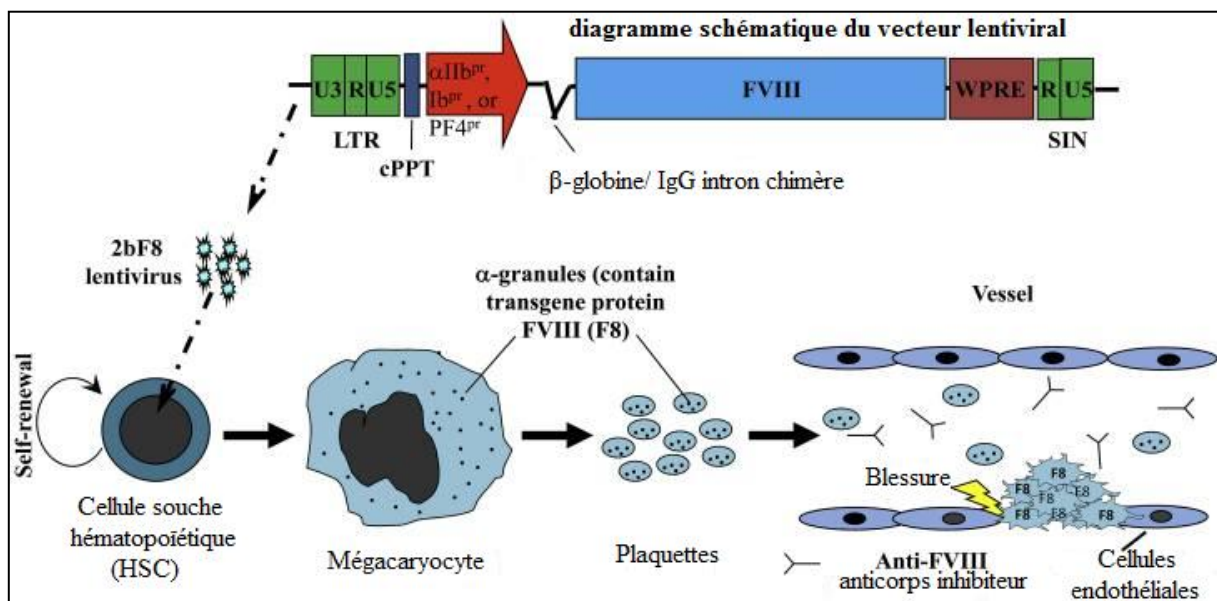
### I.3.2. Nouvelles méthodes

#### ➤ Approche plaquettaire

Une nouvelle approche du traitement de l'hémophilie A par la thérapie génique est le ciblage des plaquettes.

Les plaquettes sont des cellules abondantes circulant dans le sang avec les capacités distinctives de stockage et d'administration et des rôles fondamentaux dans l'hémostase et l'immunité. Le facteur VIII dans les plaquettes sous contrôle du promoteur plaquettaire entraîne le stockage du FVIII avec son facteur protéique Von Willebrand (VWF) dans les granules  $\alpha$  et la correction phénotypique de l'hémophilie A. Il est important de noter que le stockage et la séquestration du FVIII dans les plaquettes semblent restaurer efficacement l'hémostase même en présence d'anticorps inhibiteurs fonctionnels.

La délivrance de gènes induite par la transgénèse et le lentivirus a été utilisée pour introduire l'expression du FVIII spécifique des plaquettes. Un diagramme schématique de la thérapie génique plaquettaire de l'hémophilie A (figure 15) [67. 68].



**Figure 15:** Diagramme schématique de la thérapie génique plaquettaire de l'hémophilie A [68].

Les vecteurs lentiviraux hébergeant la cassette d'expression du FVIII sous le contrôle d'un promoteur spécifique des plaquettes (promoteur  $\alpha$ IIb, Ib ou PF4) sont utilisés pour transduire des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les CSH transduites subissent un auto-renouvellement

ainsi qu'une différenciation en mégacaryocytes, où la protéine transgénique FVIII sera fabriquée et stockée dans des granules  $\alpha$ , qui seront jetés dans des plaquettes circulant dans le sang. Le FVIII piégé en plaquettes sera protégé contre l'inactivation des anticorps anti-FVIII. Au site de la lésion, le FVIII (avec sa protéine porteuse VWF) sera libéré des plaquettes activées, et ainsi l'activation de l'inhibiteur dépendant du temps peut être contournée, permettant d'obtenir une meilleure hémostase [68].

## **II. Dystrophie musculaire de Duchenne**

### **II.1. Maladie**

#### **II.1.1. Définition**

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie héréditaire musculaire grave affectant les naissances masculines au 1: 3500. La DMD est causée par une mutation dans le gène de la dystrophine, codant pour une protéine nécessaire pour l'intégrité du muscle squelettique et cardiaque. L'absence de dystrophine fonctionnelle est principalement responsable de la lésion musculaire induite par la contraction musculaire excentrique, observée dans le muscle dystrophique [69].

#### **II.1.2. Symptômes**

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent au cours de la petite enfance, habituellement avant l'âge de trois ans, et la mort survient entre le milieu et la fin de la vingtaine. Quelques-uns des symptômes que l'enfant peut présenter :

- Chutes fréquentes ;
- Difficultés à grimper les escaliers ;
- Difficultés à se relever d'une chaise ;
- hypertrophie progressif des mollets ;
- Tendance à marcher souvent sur ses orteils et à se pencher en arrière pour maintenir son équilibre ;
- Progressivement, cette faiblesse entraînera des difficultés à marcher et l'enfant aura besoin d'un fauteuil roulant. Graduellement, tous les muscles deviendront extrêmement affaiblis y compris les muscles du cœur et de la respiration [70].

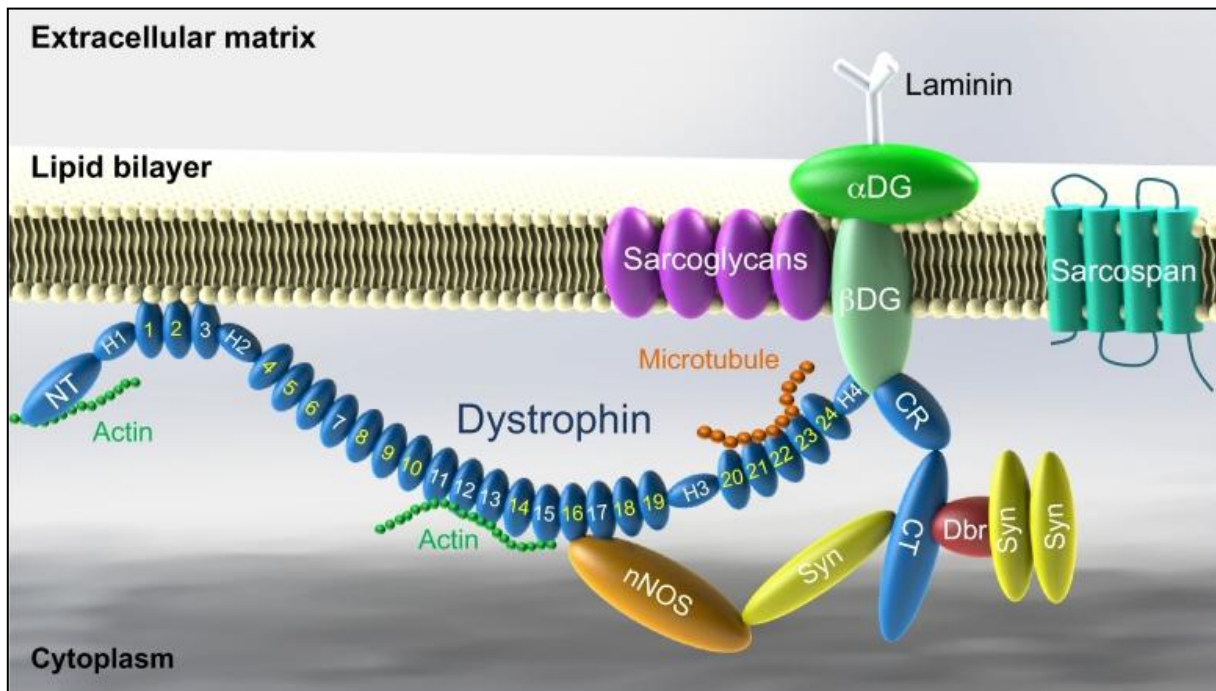
### **II.1.3. Transmission**

Le gène DMD responsable de la maladie récessive étant situé sur le chromosome X, 99,9 % des malades sont des garçons. Les femmes peuvent être porteuses d'une mutation affectant ce gène. Mais comme elles possèdent deux chromosomes X, et donc deux copies du gène DMD, elles développent extrêmement rarement la maladie [71].

### **II.1.4. Dystrophine**

Le gène de la dystrophine, appelé gène DMD, s'étend sur 2,4 mégabases le long du bras court du chromosome X (Xp21.2), soit est le plus grand locus génétique connu dans le génome humain. Il contient 79 exons qui codent pour un ARNm de 14 kb. Sa traduction génère une grande protéine de 3685 acides aminés avec une taille moléculaire de 427 kDa appelée dystrophine (figure 16). Cette protéine est localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires [72,73].





**Figure 16 :** Structure de la dystrophine [74].

La dystrophine est une énorme protéine de type bâtonnet (427 kDa) localisée sous la surface interne de la membrane plasmique de la myofibre dans les muscles squelettiques et cardiaques. La dystrophine fonctionne à travers quatre domaines structuraux majeurs. Le domaine N-terminal se lie à la F-actine des structures cytosquelettiques, tandis que le domaine C-terminal riche en cystéine (CR) avec le C-terminal distal (CT), ancre à la membrane plasmique via la protéine associée à la dystrophine (DAP) complexes. Le domaine de la tige centrale contient 24 répétitions de tige en triple hélice et quatre charnières. Ainsi, la dystrophine réticule et stabilise la membrane des cellules musculaires et le cytosquelette. L'absence de dystrophine fonctionnelle entraîne la perte de complexes DAP et provoque une instabilité de la membrane plasmique de la myofibre. Ces déficiences entraînent à leur tour des dommages musculaires chroniques et une pathologie dégénérative [71].

## II.2. Modèles animaux

Il existe deux modèles animaux naturels pour la DMD, les souris mdx 1 et les chiens atteints.

### II.2. 1. Souris

Le modèle animal le plus largement utilisé pour la recherche DMD est la souris mdx. Il a été découvert au début des années 1980 [74].

La souris mdx est le modèle le plus populaire pour la dystrophie musculaire de Duchenne, qui présente une mutation naturelle dans l'exon 23 de la dystrophine murine. Cependant, cette souris ne montre pas de faiblesse au degré que l'on voit dans la maladie humaine. La raison en est peu claire, bien que des données récentes suggèrent qu'une différence de longueur des télomères entre les espèces pourrait être responsable. D'autres modèles de souris incluent le mdx<sup>5cv</sup>, qui a une mutation artificiellement induite dans l'exon 10 et les souris mdx qui sont simultanément déficientes en utrophine (protéine similaire à la dystrophine, exprimée essentiellement durant la vie foetale) [75].

### **II.2.2. Chien**

Contrairement aux souris mdx, l'évolution clinique des chiens Cxmd est très similaire à celle des humains DMD, caractérisée par une atrophie musculaire progressive, une dégénérescence, une fibrose, et une durée de vie raccourcie. Mais à cause du faible coût de la souris mdx et de sa courte durée de gestation, elle reste le modèle animal le plus utilisé [76].

Des mutations spontanées du gène de la dystrophine entraînant une dystrophie musculaire liée au chromosome X ont été identifiées chez plusieurs races de chiens domestiques: le Golden Retriever, le Rottweiler et le pointeur aux cheveux ; un modèle beagle a également été produit. Parmi ceux-ci, le chien souffrant de dystrophie musculaire Golden Retriever (GRMD) a été le plus étudié et le mieux caractérisé présente des changements musculaires qui modélisent la pathogenèse humaine beaucoup plus fidèlement que la souris mdx. Pour ces raisons (et en l'absence d'autres grands modèles de DMD), le modèle GRMD a trouvé sa faveur ces dernières années [77].

### **I.2.3. Autres modèles**

#### **A. Poisson-zèbre**

Les modèles de dystrophie musculaire du poisson-zèbre sont devenus de plus en plus populaires en raison des attributs suivants: taille compacte, capacité proliférative, facilité de traçabilité génétique et embryons transparents faciles à manipuler. Bien qu'il existe des différences physiologiques et anatomiques évidentes entre le poisson zèbre et les humains, le poisson zèbre offre de nombreux avantages dans l'identification des gènes de la maladie et l'étude des thérapies potentielles [75].

## **B. Chats**

Le cas du chat est particulier. Ne possédant pas de dystrophine. Cependant, ils possèdent moins les signes phénotypiques caractéristiques de la DMD que les autres modèles animaux. De plus, leurs muscles sont hypertrophiques, causant d'ailleurs à long terme des problèmes respiratoires et cardiaques pouvant même provoquer leurs décès. Cela fait que ce modèle animal est très peu utilisé [78].

Il existe donc divers modèles animaux pour étudier la DMD. Il y a cependant deux modèles qui en ressortent. La souris mdx, qui malgré sa faible ressemblance phénotypique avec les patients dystrophiques, reste un modèle facile à utiliser et peu onéreux. Le deuxième modèle est le chien GRMD car son phénotype se rapproche beaucoup de celui des patients DMD mais il reste cher et peu disponible [78].

## **II.3. Utilisation de la thérapie génique**

La thérapie génique dans la DMD consiste en l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène DMD dans les fibres musculaires dans le but de restaurer la fonction musculaire, y compris la génération de force et la résistance aux dommages induits par la contraction musculaire [72].

### **II.3.1. Remplacement du gène**

La thérapie génique consiste à remplacer le gène défectueux ou manquant par un gène thérapeutique. Dans la DMD, il s'agit de remplacer le gène DMD altéré par un gène de dystrophine sans anomalie [79].

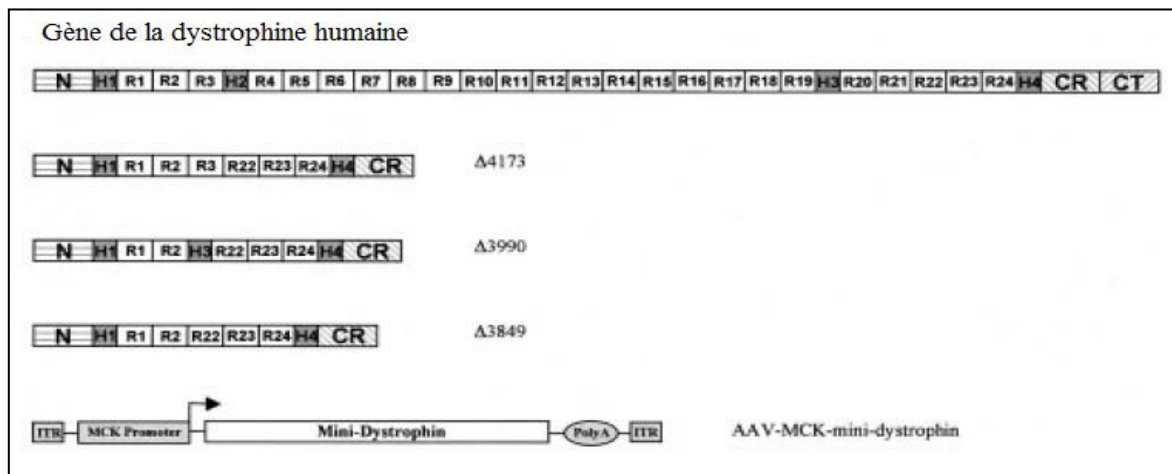
La taille de la dystrophine est très grande a rendu difficile l'utilisation de la thérapie génique conventionnelle car la capacité de 8 kb des vecteurs adénovirus classiques est insuffisante pour contenir l'ADN complémentaire entier de 14 kb de la dystrophie ne peut être transporté que par des adénovirus [80]. Les différents types de vecteurs permettant le transfert du gène thérapeutique

jusqu'au noyau des cellules malades : les vecteurs viraux (virus dont les éléments pathogènes sont remplacés par le gène thérapeutique), les vecteurs synthétiques (plasmide...) [79].

### II.3.1.1. Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux les plus utilisés sont les AAV. Actuellement, ce sont les vecteurs viraux les plus efficaces pour transférer un gène dans un organisme vivant. Ils présentent cependant l'inconvénient de ne pouvoir incorporer que des gènes de petite taille. Le gène de la dystrophine humaine étant très grand, les chercheurs fabriquent des minigènes de dystrophine qui codent une micro- ou une minidystrophine, c'est-à-dire des dystrophines fonctionnelles et plus courtes [81].

Les gènes de mini-dystrophine (mDYS) ou micro-dystrophine ( $\mu$ DYS) selon les auteurs (et la longueur du transgène) sont construits en supprimant des exons codant pour le domaine en bâtonnets et la partie C-terminale (figure 17). Les gènes de minidystrophine ont ensuite été clones entre un promoteur MCK (Muscle Créatine Kinase) et une séquence poly (A) dans des vecteurs AAV [82].



**Figure 17** : Construction de gène minidystrophine hautement tronqués [71].

Les études menées chez la souris mdx (modèle animal de la dystrophie musculaire de Duchenne) ont montré que les AAV couplés à un gène de micro- ou de mini-dystrophine restaurent l'expression de la micro-ou mini-dystrophine en quantité quasi-normale et ce dans de nombreux muscles squelettiques et dans le muscle cardiaque. La force des muscles traités est souvent améliorée ainsi que l'espérance de vie des souris [71].

En mars 2009, un essai chez l'homme est en voie de s'achever (équipe de J.Mendell). Il a pour but d'évaluer la faisabilité et la tolérance de l'administration en intramusculaire d'un AAV-mini-dystrophine chez 6 garçons atteints de dystrophie musculaire de Duchenne. Le problème le plus important posé par les AAV est celui de la réaction du système de défense de l'organisme (réaction immunitaire) qu'ils peuvent provoquer. Pour centrer ce problème, les chercheurs pensent utiliser des traitements qui modulent l'activité du système immunitaire (immunosuppresseurs) pour modérer, voire éteindre complètement, la réaction immunitaire de rejet contre le gène thérapeutique et le vecteur viral [83].

### **II.3.1.2. Les vecteurs synthétiques**

Une autre solution consiste à transporter le gène de la dystrophine par un autre moyen que les vecteurs viraux, par exemple avec des vecteurs synthétiques comme les plasmides. Ces vecteurs peuvent contenir des gènes de grande taille et sont moins susceptibles de provoquer une réaction immunitaire importante : ils ne renferment pas de protéines immunogènes. Utilisés chez la souris mdx, ils ont permis de restaurer l'expression de la dystrophine dans de nombreuses fibres musculaires. L'efficacité du transfert de gène semble, cependant, moindre qu'avec les AAV, en injection intra-musculaire. De plus, ils ne permettent pas une expression à long terme du gène thérapeutique [72].

D'autres techniques ont été utilisées afin d'améliorer la transfection : la technique hydrodynamique et l'électroporation. Des résultats intéressants ont été démontrés chez le chien. Mais ces méthodes semblent trop coûteuses à développer pour prendre le pas sur l'utilisation de vecteurs viraux. De plus, tous les muscles ne peuvent pas être traités par ces techniques : l'électroporation nécessite une intervention locale pour chaque muscle et la technique hydrodynamique ne peut être réalisée que sur un bras ou une jambe mais pas pour la tête ou le tronc [16].

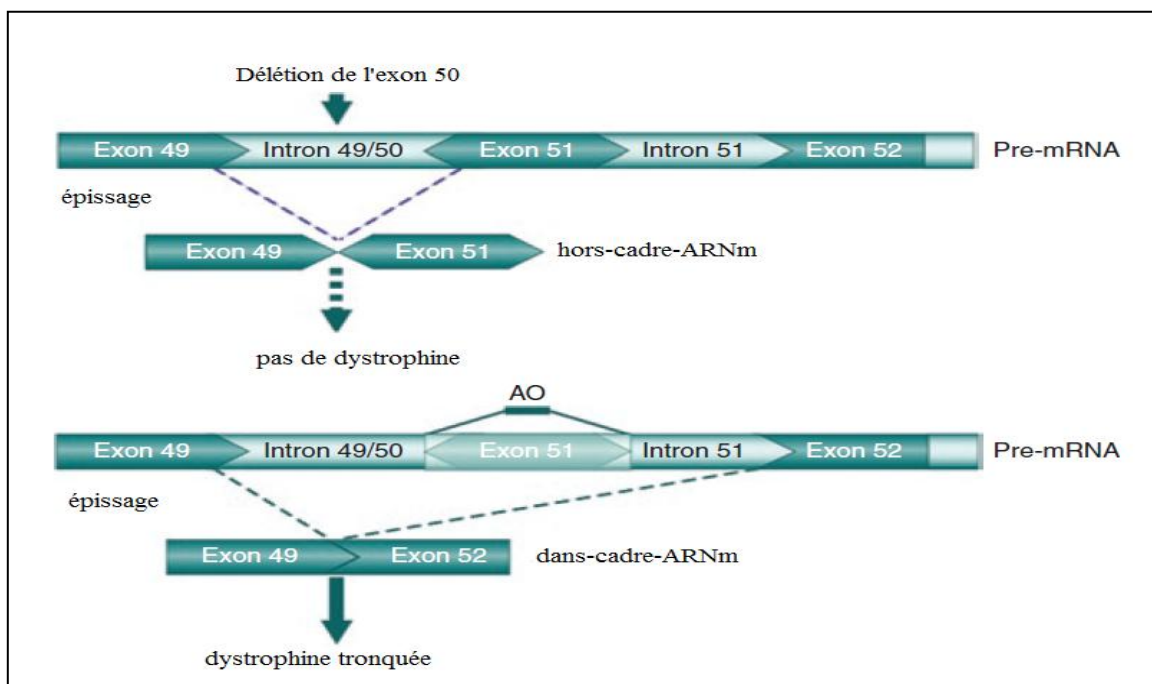
### **II.3.2. Saut d'exon**

La dystrophie musculaire de Duchenne est due à des anomalies dans le gène de la dystrophine. Dans 65% des cas, il s'agit de délétions d'un ou plusieurs exons qui provoquent un décalage du cadre de lecture. La protéine n'est donc pas synthétisée.

Le saut d'exon à médiation antisens visant la restauration de cadres de lecture est actuellement une application thérapeutique prometteuse pour la (DMD) [84]. Cette approche est

spécifique de la mutation, mais comme la majorité des patients DMD, la dystrophine est supprimée en interne, mais reste partiellement fonctionnelle en raison de la présence des domaines N- et C-terminaux essentiels. En utilisant des molécules antisens capables d'interférer avec les signaux d'épissage, le saut des exons spécifiques ciblés dans le pré-ARNm de la dystrophine peut restaurer le cadre de lecture ouvert et permettre l'expression d'une dystrophine supprimée mais fonctionnelle chez les patients DMD (Figure 18). Ces molécules sont de petits ARN ou ADN modifiés synthétiques appelés oligonucléotides antisens (AO) capables de lier des sites introniques ou exoniques spécifiques de pré-ARNm. L'annelage à des motifs d'épissage sélectionnés, l'AO masque essentiellement l'exon ciblé de la machinerie d'épissage, favorisant ainsi l'exclusion d'exon spécifique de l'ARNm mature. Deux types d'AO sont principalement utilisés: le 2'-O-méthylphosphorothioate (2OMP) et le phosphorodiamidate morpholino oligomère (PMO) [72].

La majorité du développement d'AO s'est concentrée sur le fait de sauter les exons individuels qui bénéficieront au plus grand nombre de patients. Par exemple, l'exclusion de l'exon 51 peut potentiellement être appliquée à 13% de toutes les mutations DMD, exon 45 à 8,1% et exon 53 à 7,7% .Le saut d'exon peut également être utilisé pour traiter des mutations non-sens, qui représentent environ 15% des mutations DMD, en sautant l'exon qui contient la mutation elle-même. Bien sûr, dans de tels cas, le cadre de lecture doit toujours être maintenu et donc le saut d'un seul exon pour ces mutations est limité aux exons qui ne sont pas en décalage de trame. Cependant, cela s'appliquerait encore à environ 47% des patients atteints de mutation non-sens [85].



**Figure 18 :** Exemple de saut d'exon chez un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne(DMD) présentant une délétion de l'exon 50 [72].

Les oligonucléotides anti-sens peuvent être soit injectés seuls (oligonucléotides anti-sens libres) dans l'organisme, soit transportés par un vecteur viral AAV (oligonucléotides anti-sens vectorisés). Son intégration dans la cellule permet de faire produire l'oligonucléotide anti-sens par l'organisme lui-même [76].

### **II.3.3. Modification du gène de la dystrophine**

#### **A. Surexpression de l'utrophine**

L'utrophine est une protéine proche de la dystrophine puisqu'elle présente 80% d'homologie avec elle. Durant le développement embryonnaire, l'utrophine est exprimée sous la membrane des cellules musculaires, comme la dystrophine l'est après la naissance. Par contre, durant la vie post-natale, l'expression de l'utrophine diminue et celle-ci n'est plus présente qu'au niveau des jonctions neuromusculaires. Compte-tenu de son homologie avec la dystrophine, les chercheurs ont émis l'hypothèse que l'utrophine pourrait compenser l'absence de dystrophine dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). De nombreuses études ont été menées pour augmenter l'expression (surexpression) de l'utrophine chez la souris mdx. Les chercheurs ont utilisé différentes approches : souris mdx transgéniques surexprimant génétiquement le gène de l'utrophine, approche pharmacologique, thérapie génique. Les résultats ont montré que l'utrophine lorsqu'elle est fortement surexprimée dès le stade embryonnaire peut remplacer efficacement et fonctionnellement la dystrophine. Par contre, les surexpressions stimulées après la naissance chez des souris mdx adultes ont donné des résultats moins intéressants [79].

#### **B. Modification du gène DMD avec des méganucléases**

Un nouveau traitement alternatif pour la DMD repose sur la restauration du cadre de lecture de la dystrophine en induisant une micro-délétion ou une micro-insertion dans le gène DMD. Ceci peut être fait en induisant des cassures double brin à la fin de l'exon, qui précède une suppression, ou au début d'un exon, qui suit une suppression. Ces cassures à double brin peuvent être induites avec des méganucléases spécialement conçues ou des nucléases à doigts de zinc. Ils sont spontanément réparés par un processus appelé non-homologue, qui introduit une micro-insertion ou une micro-délétion. En variante, les cassures à double brin peuvent être réparées par recombinaison

homologue en fournissant un plasmide donneur contenant la séquence codante qui est déléetée dans le génome du patient [72].



# Conclusion

La thérapie génique est développée pour des maladies dont le traitement actuel est trop contraignant ou trop peu efficace. Avec la thérapie génique, on peut aujourd'hui espérer soigner des maladies incurables comme les maladies génétiques qui touchent principalement des enfants et dont la durée de vie est très écourté par la maladie, la thérapie génique représente la seule chance de survie.

La recherche se poursuit afin de trouver de nouvelles molécules capables d'assurer la fonction de vecteurs en thérapie génique ainsi que l'optimisation de nouvelles méthodes améliorant l'efficacité de ces vecteurs. Il est évident que le vecteur idéal n'existe pas encore, qu'il sera sûrement spécifique d'un type de maladie et que sa création nécessitera la combinaison de plusieurs vecteurs existants avec des méthodes d'amélioration.

Actuellement, les vecteurs les plus utilisés en essais cliniques sont les adénovirus (23,5%), les rétrovirus (19,1%) et l'ADN nu ou les plasmides (17,7%). On note ainsi que les vecteurs les plus utilisés ne sont pas forcément les plus efficaces, mais les plus étudiés, essentiellement du fait de leur innocuité et de leurs effets secondaires bien connus ou maîtrisés.

Dans les deux illustrations de l'hémophilie A et la myopathie de Duchenne, la thérapie génique pour l'hémophilie A a subi de nombreux échecs, en partie dus à une inadéquation entre les réactions des modèles animaux et celles de l'espèce humaine. La création d'un nouveau transgène ainsi que l'amélioration des vecteurs, et en particulier la laisse à penser que de nouveaux essais cliniques seront acceptés et donneront des résultats si ce n'est probant, du moins exploitables. Dans la myodystrophie de Duchennea la thérapie génique a été développée sous différentes formes afin d'obtenir un traitement valable. Cependant qu'aucune piste actuellement à l'étude ne permet de soigner la maladie, mais en réduit seulement les symptômes. Le traitement qui paraît le plus prometteur est le saut d'exon. Les essais cliniques sont en cours afin d'aboutir à un traitement fiable. Pourtant, cette technique doit être modulée en fonction des mutations présentes chez le patient. De nombreuses études seront encore nécessaires afin que tous puissent profiter d'un traitement adapté.

Enfin on peut dire que la thérapie génique est apparue, de nombreuses techniques se sont développées. Le nombre de vecteur a augmenté et on les maitrisé de mieux en mieux.

# **Références bibliographiques**

- 1- **Cavazzana M., Six E., Lagresle-Peyrou C., André-Schmutz., Hacein-Bey-Abina S.** (2016). Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: Where Do We Stand?. *Hum Gene Ther.* 27(2):108-16.
- 2- **Touzot F., Hacein-Bey-Abina S., Fischer A., Cavazzana M.** (2014). Gene therapy for inherited immunodeficiency. *Expert Opin Biol Ther.* 14(6):789-98.
- 3- **Choudhury SR., Hudry E., Casey A. Maguire CA., Miguel Sena-Esteves MS., Xandra O. Breakefield Xo., Grandi P.** (2017). Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology.* 120: 63–80.
- 4- **Cohen-Haguenaer O.** (2011). Thérapie génique des maladies rares. *La Revue de médecine interne.*32 :210-212.
- 5- **Kahn A.** (2000). Dix ans de thérapie génique : déceptions et espoirs .*Institut Cochin de génétique moléculaire (ICGM).* 202 :16-20.
- 6- **Jordan B.** (2007). Thérapie génique : Espoir ou illusion ? .Paris. Pp17-18.
- 7- **Lafontaine F.** (2012). Perspectives des thérapies géniques en 2012 : une analyse au travers des biotechnologies employées, de la maladie d'Alzheimer et du cancer bronchique a non petites cellules. Université Henri Poincaré - Nancy 1. Faculté de pharmacie. Thèse de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.
- 8- **Strancher T., Read A.** (2012). Génétique moléculaire humain.4<sup>ème</sup> édition. Médecine sciences. Italie. Pp 697-698.
- 9- **Fischer A.** (2017). Naissance de la thérapie génique. *La revue du praticien.*67:1036-1042.
- 10- **Escors D., Breckpot K.** (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 58(2): 107–119.
- 11- **Manno CS., Pierce GF., Arruda VR., Glader B., Ragni M., Rasko JJ., Ozelo MC., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi PK., Nakai H., Jiang H., Mingozzi Chew A., Leonard D., Wright JF., Lessard RR., Sommer JM., Tigges M., Sabatino D., Luk AF., Couto L., Ertl HC., High KA., Kay MA.,** (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine.* 12(3):342-7.
- 12- **Ségalat L.** (2007). La thérapie Génique Révolution médicale entre rêve et réalité. Ellipses Edition marketing S.A. Pp: 21-23.

- 13- **Kaufmann K B., Buning H., Galy A., Schambach A., Grez M.** (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med.* 5: 1642–1661.
- 14- **Cohen-Haguenaer O.** (2001). Thérapie génique. Paris. Pp : 2.
- 15- **Morin Y.** (2001). Petit Larousse de la Médecine. édition Edith Ybert. Pp 938.
- 16- **Hellez J.** (2014). Utilisations de la thérapie génique. Université de claud- bernard. Faculté médecine-pharmacie. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. lyon.
- 17- **Jord L B., Carerey JC., Bamshad M J., White RL.** (2004). génétique médicale Espagne. Pp 349-353.
- 18- **Gargouri M.** (2010). Mise au point de nanoparticules polycationiques pour le transfert de gènes. Université henri poincare. Faculté de Pharmacie. Thèse de doctorat. Nancy.
- 19- **Krahan M., Barra Y., Bérout C.** (2012). Génétique et biotechnologie. Ellipses édition marketing. Paris. Pp 116.
- 20- **Etienne J., Clauser E., Housset C., Roingeard P.** (2006). biochimie génétique biologie moléculaire. 9<sup>ème</sup> édition entièrement refondu. France. Pp234-239.
- 21- **Imazu S., Nakagawa S., Nakanishi T., Mizuguchi H., Uemura H., Yamada O., Mayumi T.** (2000). A novel nonviral vector based on vesicular stomatitis virus. *J Control Release.* 68: 187-194.
- 22- **Niidome T., Huang L.** (2002). Gene therapy progress and prospects: non viral vectors. *Gene Ther.* 9: 1647-1652.
- 23- **Evans C H. Huard J.** (2015). Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol.* 1(4):234-42
- 24- **Cordelier P., Buscail L.** (2005). La thérapie génique : une réalité pour demain ?. *Gastroenterol Clin Biol.*29: 724-731.
- 25- **Salazar-Montes A M., Hernández-Ortega L D., Lucano-Landeros M S., Armendariz-Borunda J.** (2015). New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol.* 21(13):3813-25.
- 26- **Vanbelle P.** (2008). Intérêt du modèle canin en thérapie génique. École nationale vétérinaire d'alfort. Faculté de médecine de Créteil. Thèse pour le doctorat vétérinaire.
- 27- **Öner A.** (2017). Recent Advancements in Gene Therapy for Hereditary Retinal Dystrophies. *Turk J Ophthalmol.* 47(6):338-343.

- 28- **Witlox MA., Lamfers ML., Wuisman PI., Curiel DT., Siegal GP.** (2007). Evolving Gene Therapy Approaches for Osteosarcoma using Viral Vectors: Review. *Bone*. 40(4):797-812.
- 29- **Hulot J S., Ishikawa K., Hajjar R J.** (2016). Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *European Heart Journal*. 37, 1651–1658.
- 30- **Coura R S., Nardi N B.** (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene Therapy. *Virology Journal*. 4:99.
- 31- **Pasternak J K.** (2003). Génétique Moléculaire Humane .Traduction de la 1<sup>ère</sup> édition. Américaine .Pp 446.
- 32- **Étienne J., Clauser E.** (2001). Biochimie Génétique Biologie Moléculaire. Paris .Pp 397.
- 33- **Bertrand L.** (2003). Nouveaux vecteurs synthétiques fonctionnels pour le transfert de gènes. Université de nice–sophia. Thèse Présentée pour obtenir le grade de Docteur en sciences. Français.
- 34- **Noblet J B.** (2011). Thérapie génique et dopage. Université de limoges. Faculté de Medecine et de Pharmacie. Thèse de doctorat en pharmacie.
- 35- **Floch V., Abgrall J., Férec C.** (1998). Cationic lipids gene transfer non viral vectors: potential application to hematopoietic cells application potentielle aux cellules d'origine hématopoïétique. *Hématologie*. 4: 57-66.
- 36- **Cottier., Guerry.** (2000). Génie Génétique et Clonage. Pp 107.
- 37- **Al-Dosari MS., Gao X.** (2009). Non viral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal*: 11: 0400-0671.
- 38- **Mansouri S., Lavigne P., Corsi K., Benderdour M., Beaumont E., Fernandes JC.** (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57: 1–8.
- 39- **Najmul H., Saini S.** (2014). Gene therapy: Current status and future perspectives. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. 5:586-593.
- 40- **Ramamoorth M., Narvekar A.** (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9(1): 01-06.

- 41- **Cordelier P., Buscail L.**, (2004). La thérapie génique: application aux cancers digestifs. *Hépatogastro et Oncologie Digestive*. 11 : 221-33.
- 42- **Delalande A.** (2011). Méthodes de transfert de gènes non virales: application aux pathologies tendineuses. Thèse de doctorat. Sciences agricoles. Université d'Orléans. Français.
- 43- **Ramsey T.** (2013). A Review of the Main Viral and Non-Viral Vectors for Gene. *Research Gate*. 1-9.
- 44- **Nayerossadat N., Maedeh T., Abas P.** (2012), Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*. 27:2277-9175.
- 45- **Liu X., Liu M., Wu L., Liang D.** (2017). Gene Therapy for Hemophilia and Duchenne Muscular Dystrophyn in China. *Human Gene Therapy*. 213:1-14.
- 46- **Petrus I., Chuah M., Vanden DT.** (2010). Gene therapy strategies for hemophilia: benefits versus risks. *J Gene Med*. 12:797-809.
- 47- **Franchini M., Mannucci P M.** (2014). The history of hemophilia. *Semin Thromb Hemost*. 40:571-576.
- 48- **Balkaransingh P., Young G.** (2018). Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A. *Ther Adv Hematol*. 9:49-61.
- 49- **Sherman A., Biswas M., Herzog RW.** (2017). Innovative Approaches for Immune Tolerance to Factor VIII in the Treatment of Hemophilia A. *Front Immunol*. 8: 1604.
- 50- **Boehlens F., Müller P R., Brand B., Weid N., Marbet G A., Tsakiris D A.** (2011). Hémophilie dans la pratique du médecin de famille. *Forum Med Suisse*. 11:452-457.
- 51- **Franchini M.** (2006). Acquired hemophilia A. *Hématologie*. 11: 119-125.
- 52- **Paroskie A., Gailani D., DeBaun MR., Sidonio RF Jr.** (2015). A cross-sectional study of bleeding phenotype in haemophilia A carriers. *Br J Haematol*. 170(2):223-8.
- 53- **Berkane M.** (2004). Hémophilie et stomatologie. 1<sup>ère</sup> édition. Alger. Pp10-13.
- 54- **Kaneko H., Kikuchi K., Nakai M., Fuchimoto D., Suzuki S, Sembon S., Noguchi J., Onishi A.** (2017). Establishment of a strain of haemophilia-A pigs by xenografting of foetal testicular tissue from neonatally moribund cloned pigs. *Sci Rep*. 7(1):17026.

- 55- **Madouni S., Madani K.** (2014). La prise en charge de l'hémophilie. Faculté de médecine. Alger.
- 56- <http://www.jle.com/fr>.
- 57- **Rogers GL., Herzog RW.** (2015). Gene therapy for hemophilia. *Prog Mol Biol Transl Sci.*20: 556–603.
- 58- **Yen C., Ni F., Yang Y., Chou S., Yu I., Lin S.** (2016). Current animal models of hemophilia:the state of the art. *Thrombosis Journal.* 14: 22.
- 59- **Sabatino D E., Nichols T C., Merricks E., Bellinger DA., Herzog R., Monahan P E.** (2012). Animal Models of Hemophilia. *Prog Mol Biol Transl Sci.*105: 151-209.
- 60- **Lozier JN., Nichols TC.** (2013). Animal Models of Hemophilia and Related Bleeding Disorders. 50(2): 175–184.
- 61- **Kashiwakura Y., Mimuro J., Onishi A., Iwamoto M., Madoiwa S., Fuchimoto D.** (2012). Porcine model of hemophilia A. *Plos One.* 11(7): 1-6.
- 62- **Montgomery RR., Shi Q.** (2010). Alternative strategies for gene therapy of hemophilia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology.*197-202.
- 63- **Doering CB., spencer HT.** (2009). Advancements in gene transfert–based herapy for hemophilia A. *Expert Rev Hematol.* 9(2):197-202.
- 64- **Chuah M L, Collen D, VandenDriessche T.** (1998). Gene therapy for hemophilia: hopes and hurdles. *Critical Reviews in Oncology:Hematology.* 28:153–171.
- 65- **Vendendriessche T., Collen D., Chuach MK.** (2003). Gene therapy for the hemophilias. *J Thromb haemost.* 1(7):1550-8.
- 66- **Sabatino DE., Lange AM., Altynova ES., Sarkar R., Zhou S., Merricks EP., Franck HG., Nichols TC., Arruda VR., Kazazian HH.** (2011). Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors. *Mol Ther.* 19 (3): 442-449.
- 67- **Du LM., Nurden P., Nurden AT., Nichols TC., Bellinger DA., Jensen ES., Haberichter SL., Merricks E., Raymer RA., Fang J., Koukouritaki SB., Jacobi PM., Hawkins**



- TB., Cornetta K., Shi Q., Wilcox DA.** (2013). Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with hemophilia A. *Nat Commun.* 4: 2773.
- 68- **Shi Q.** (2018). Platelet-Targeted Gene Therapy for Hemophilia. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 9:100-108.
- 69- **Marrocco V., Fior P., Bendetti A., Pissu S., Rizzuto E., Musaro A., Madaro L., lozanoska-ochser B., Bouché M.** (2017). Pharmacological inhibition of PKC $\theta$  counteracts muscle disease in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *EBioMedicine.* 16:150-161.
- 70- **Broun S., D'Andon A.** (2005). Thérapies innovantes et conventionnelles: multiplication des essais chez l'homme dans les MNM. *Congrès international de myologie (international congress of myology).* 79 :Pp1-2.
- 71- **Wang B., Li J., Xiao X.** (2000). Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(25):13714-13719.
- 72- **Pichavant C., Aartsma-Rus A., Clemens PR., Davies KE., Dickson G., Takeda S, Wilton SD., Wolff JA., Christine I., Wooddell CI., Xiao X., Tremblay JP.** (2011). Current Status of Pharmaceutical and Genetic Therapeutic Approaches to Treat DMD. *The American Society of Gene & Cell Therapy.* 19: 830–840.
- 73- **Maggio I., Chen X., Goncalves MS.** (2016). The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Med.* 8:1(59).
- 74- **Mcgreevy JW., Hakim CH., Mcintosh MA., Duan D.** (2015). Animal models of duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis model mech.* 8(3):195-213.
- 75- **Liew WKM., Kang PB.** (2013). Recent developments in the treatment of Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders.* 6 (3): 147-160.

- 76- **Wang Z., Chamberlain JS., Tapscott SJ., Storb R.** (2009). Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. *Institute of Laboratory Animal Resources Journal*. 50 (2): 187-198.
- 77- **Collins CA., Morgan JE.** (2003). Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *International Journal of Experimental Pathology*. 84 (4): 165-172.
- 78- **Pichavant C.** (2010). Thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne. Université Laval. Faculté de Médecine. Université laval. Thèse de doctorat.
- 79- **Okada T., Takeda S.** (2013). Current challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Pharmaceuticals*. (6):813-836.
- 80- **Fernandez C., Halbert C., Maues de Paula A., Figarella-Branger D., Chabrol B., Pellissier J F.** (2010). Dystrophies musculaires liées au gène DMD: myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, formes féminine et atypiques. 17-175.
- 81- **Muir LA., Chamberlain JS.** (2009). Emerging strategies for gene therapy of the muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med*.11:18.
- 82- **Goyenvalle A., Seto JT., Davies KE., Chamberlain J.** (2015). Thérapeutique approaches to muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 20 (1):69-78.
- 83- **Mendell JR., Rodino-Klapac L., Sahenk Z., Malik V., Kaspar BK., Walker CM., Clark KR.** (2012). Gene Therapy for Muscular Dystrophy: Lessons Learned and Path Forward. *Neurosci Lett* .527(2): 90–99.
- 84- **Aartma-Rus A., Fokkema I., Verschuuren J., Ginjaar I., Van deutekom J., Van omen GT, Den Dunnen JT.** (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutation. *Hum Mutat*. 30(3):293-9.
- 85- **Douglas AGL., Wood MJA.** (2013). Splicing therapy for neuromuscular diseases, *Molecular and cellular neurosciences*. 56 (100):169-185.

# **Annexes**

**Annexe 1:** Propriétés des différents types de vecteurs utilisés en thérapie génique.

	<b>Rétrovirus</b>	<b>lentivirus</b>	<b>Adénovirus</b>	<b>AAV</b>	<b>Herpès simplex</b>
<b>Génome viral</b>	ARNsb 7-11 kb	ARNsb ~9 kb	ADN db Jusqu'à 38 kb	ADNsb 4.7 kb	ADNdb 120-200 kb
<b>Capacités d'empaquetage</b>	7-8 kb	8kb	30kb	4.8kb	30kb
<b>Intégration dans le génome de l'hôte</b>	Oui	Oui	Non	Rarement (< 10%)	Non
<b>Mode d'administration</b>	Exo vivo In situ	Exo vivo In situ	Exo vivo In situ	Exo vivo	In situ
<b>Expression du transgène</b>	Longue durée	Longue durée et haut degré d'expression	Transitoire, mais haut degré d'expression	Haut degré d'expression à moyen à long terme (année)	Potentiel d'expression de longue durée
<b>Cellules cible</b>	Cellules se divisant seulement	Cellules se divisant ou non; tropisme varie	Cellules se divisant ou non	Cellules se divisant ou non	Système nerveux central
<b>Réponse immunitaire</b>	Faible	Faible	Élevée	Relativement faible	Élevée
<b>Problèmes de sécurité</b>	Mutagène	Mutagène	Réponse inflammatoire	Aucune	
<b>Avantages</b>	Expression stable dans les cellules filles	Expression stable dans les cellules filles	Transfert efficace dans la plupart des tissus	Non pathogénique	-Taille du transgène -Spécificité cellulaire (neurones) -Infecte les cellules en division ou non
<b>Désavantages</b>	S'intègre uniquement dans les cellules qui se divisent et risquent de développer des cancers au moment de l'intégration	risque de développer des cancers au moment de l'intégration	L'enveloppe virale peut induire une forte réaction immunitaire	transfert de petites séquences d'ADN	-Expression transitoire -expression modérée -neurotoxicité mal caractérisée -risque mutagène potentiel -immunité préexistente de l'hôte



<b>Réalisé par :</b> BOUNAR Siryne MERABET Kenza	<b>Président :</b> Dr. AISSAOUI S. <b>Examinateur :</b> Pr. RECHRECHE H. <b>Encadreur:</b> BENSEGHIER S.
--	--

## Thème : La thérapie génique et les maladies génétiques

### Résumé

La thérapie génique regroupe l'ensemble des technologies permettant le transfert du matériel génétique tel que l'ADN ou l'ARN à viser thérapeutique dans un organisme vivant. Elle recouvre donc deux notions très différentes: la thérapie génique somatique et la thérapie génique germinale. La stratégie de la thérapie génique est une thérapeutique qui consiste à introduire un ou des acides nucléiques dans les cellules ou les tissus d'un individu, pour traiter ou prévenir une maladie, via un vecteur. Ces vecteurs sont classés en deux types : les vecteurs viraux, créés à partir d'un ou plusieurs virus et les vecteurs non viraux, fabriqués à partir de différentes molécules (comme les lipides). On peut aussi utiliser les acides nucléiques sans autre molécule (ADN nus). Chaque maladie présente ses particularités propres ce qui oblige à développer pour chacune d'entre elles un traitement de thérapie génique unique.

**Mots clés:** Thérapie génique, Maladie génétique, vecteur.

### Abstract

Gene therapy brings together all technologies allowing the transfer of genetic material such as DNA or RNA for therapeutic purposes in a living organism. It thus covers two very different notions; somatic gene therapy and germinal gene therapy. The strategy of gene therapy is a therapy that involves inserting one or more nucleic acids into the cells or tissues of an individual, to treat or prevent a disease, via a vector. These vectors can be classified into two types: viral vectors; created from one or more viruses and non-viral vectors; made from different molecules (such as lipids). It is also possible to use nucleic acids without any other molecule (Naked DNA). Each disease has its own particularities which makes it necessary to develop for each of them a unique gene therapy treatment.

**Key words:** gene therapy, genetic disease, vector.

### ملخص

العلاج الجيني يجمع بين مجموع التقنيات التي تسمح بنقل المادة الوراثية مثل DNA أو RNA بهدف علاجي الى الكائنات الحية، وهو يشمل مفهومين مختلفين للغاية هما العلاج الجيني الجسمي (الخلايا الجسمية) والعلاج الجيني الجنسي (الخلايا الجنسية). استراتيجية العلاج الجيني تعتمد بإدخال واحد أو أكثر من الأحماض النووية الى الخلايا أو الأنسجة المستهدفة للكائن الحي وذلك من اجل علاج أو تدارك المرض باستخدام ناقل. تصنف هذه النواقل الى نوعين: ناقلات فيروسية ، مستحدثة انطلاقا من أحد أو عدة فيروسات ، وناقلات غير فيروسية , مصنوعة من جزيئات مختلفة (مثل الدهون). يمكن أيضًا استخدام الأحماض النووية بدون أي جزيء آخر. كل مرض له مميزات الخاصة مما يستلزم ضرورة تطوير علاج فريد من نوعه للجينات.

**كلمات مفتاحية :** العلاج الجيني، الامراض الجينية، الناقل.

