

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

2015

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 6 Novembre 2015 à POITIERS
par Mademoiselle ESTEVE Julie
née le 25/04/1991

Application de la thérapie génique dans l'hyperoxalurie primitive de type 1 : utilisation des technologies TALENs et CRISPR/Cas
--

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur Christine IMBERT, Parasitologie

Membres : Monsieur le Professeur Alain KITZIS, Génétique
Monsieur le Docteur Vincent THOREAU, Biologie moléculaire
Monsieur le Docteur Emmanuel RICHARD, Biothérapie
Monsieur le Docteur Jean-Marc BLOUIN, Biothérapie

Directeur de thèse : Madame le Professeur Guylène PAGE, Biothérapie

PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, pharmacie clinique PU-PH
- MARCHAND Sandrine, pharmacocinétique PU-PH

- CARATO Pascal, chimie thérapeutique PR
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie PR
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie PR
- IMBERT Christine, parasitologie PR
- OLIVIER Jean Christophe, galénique PR
- PAGE Guylène, biologie cellulaire PR
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique PR
- SARROUILHE Denis, physiologie PR
- SEGUIN François, biophysique, biomathématiques PR

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, immunologie-hématologie MCU-PH
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique MCU-PH
- RAGOT Stéphanie, santé publique MCU-PH
- THEVENOT Sarah, hygiène et santé publique MCU-PH

- BARRIER Laurence, biochimie MCF
- BODET Charles, bactériologie MCF
- BON Delphine, biophysique MCF
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie MCF
- CHARVET Caroline, physiologie MCF
- DEBORDE-DELAGE Marie, sciences physico-chimiques MCF
- DEJEAN Catherine, pharmacologie MCF
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique MCF
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire MCF
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie, MCF

- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie MCF
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique MCF
- INGRAND Sabrina, toxicologie MCF
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile pharmacochimie MCF
- PAIN Stéphanie, toxicologie MCF
- RIOUX BILAN Agnès, biochimie MCF
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacochimie MCF
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire MCF
- WAHL Anne, chimie analytique MCF

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Attaché Temporaire d'Enseignement et de recherche (ATER)

COSTA Damien, microbiologie

Professeur 2nd degré - anglais

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - anglais

- JORDAN Stephen

Contractuel enseignant - anglais

- SASU Elena

Le Doyen,

Année universitaire 2015 - 2016

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- EUGENE Michel, physiologie (**surnombre jusqu'en 08/2016**)
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
- GUILLET Gérard, dermatologie
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (**en détachement**)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIoT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PAQUEREAU Joël, physiologie (**jusqu'au 31/10/2015**)
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- POURRAT Olivier, médecine interne (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Remerciements

Je tiens à remercier Madame le Professeur Christine IMBERT pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Alain KITZIS, et Messieurs les Docteurs Vincent THOREAU, Emmanuel RICHARD et Jean-Marc BLOUIN pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs.

Je remercie également Messieurs Emmanuel RICHARD et Jean-Marc-BLOUIN pour m'avoir dirigée au cours des travaux expérimentaux présentés dans cette thèse ; merci pour la confiance que vous m'avez accordée depuis le début, et pour votre passion communicative pour la recherche qui m'a donné envie de continuer l'aventure avec vous pendant 3 ans supplémentaires !

Merci à Monsieur le Professeur Hubert DE VERNEUIL, directeur de l'unité Inserm U1035, pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire. Merci pour vos conseils et votre enthousiasme vis-à-vis de mes travaux et de la Recherche dans son ensemble.

Je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Madame le Professeur Guylène PAGE, avec qui j'ai apprécié échanger à propos de la thèse, de mon parcours et de la Pharmacie en général, et dont j'ai suivi avec enthousiasme les cours, travaux dirigés et travaux pratiques lors de mon cursus pharmaceutique. Merci pour votre soutien dans la rédaction de cette thèse et pour vos conseils, avisés et précieux.

Kam, ma petite mimolette, GM de mon cœur, merci pour ces années de complicité, de folie, de binôme de chapeaux où tu as su modérer mes ardeurs et améliorer ma diplomatie (ok, y'a encore du travail !). Merci pour ton canapé, l'accompagnement musical en AG (d'où qu'il vienne !), ton inoubliable chocolat chaud. Merci enfin pour ton soutien, du coin de l'œil ou de l'écran du téléphone, en effet tu as le don de rassurer, y compris sur ta santé en AG !

Antoine, merci pour ces années de Pharma à se serrer les coudes, pour toutes les bêtises de TP qui figurent au palmarès du binôme CHAVAGNAC-ESTEVE, pour les fous rires en amphi et dans toutes nos sorties ! Merci d'avoir été là, car le concours je ne l'aurais pas eu sans nos échanges, notre complicité et notre solidarité, et merci d'être encore là aujourd'hui, à Poitiers, à Paris et ailleurs.

Maria, troisième luron de mon trio de filles, et pas des moindres ! Merci pour ton rire inimitable, ta bonne humeur quasi-inébranlable (un bon fard de temps en temps, ça fait du bien, on est d'accord !) et communicative. Merci pour nos discussions, ton soutien aussi malgré la distance, car tes petits messages ont toujours été opportuns.

Merci à toute la troupe de porteurs de chapeaux à pin's, j'ai nommés Grobé, 3Q, Marie, Bilbo, Adahé, Zell et j'en oublie, qui ont rendu compliquées certaines matinées de cours, mais avec qui j'ai passé d'inoubliables moments, à Poitiers et en-dehors. Merci également pour vos conseils, plus ou moins avisés selon l'heure c'est vrai, vos sourires et votre malice. Sec impétrants !!!

Merci aux petiouts de pharma, Diane, Had ; merci pour votre sourire, votre appui à la corpo durant ces magnifiques années associatives, votre présence en réunion, en AG et en stands Santé Pub'... Et merci pour l'AG de Poitiers 2015, parce que Poital Capitale !

Merci aux compagnons de PLB que je n'ai pas encore cités, Thomas et Vincent. Merci pour les chansons, les rébellions, la pièce de théâtre en ANGLAIS et la séance photo. Merci pour les premiers de l'an, les week-ends à Douzât, les sorties en AG pour l'un, les critiques de la corpo pour l'autre (parfois constructives, je reconnais !) ! A présent que la Garonne nous tend les bras, il reste à trouver un nouveau QG !

Merci à mes parents et ma famille (désolée bro', désolée Mamie, pas de palme supplémentaire pour ce coup-là !), pour votre soutien sans faille depuis le début de mes études. Merci d'avoir été présents, dans mes moments de joie comme dans les difficultés. Merci pour votre confiance et votre enthousiasme à suivre les voies parfois compliquées que j'ai entreprises, merci d'avoir endossé avec le sourire tous les rôles que mes années d'étude ont imposés, à la fois logisticiens, psychologues, taxis, restaurateurs, blanchisseurs, et j'en passe ! Merci enfin pour la fierté dans vos yeux, car au-delà de ma satisfaction personnelle, c'est là mon plus beau cadeau de réussite.

Et merci à toi Laurent, pour avoir su apprivoiser mon caractère de cochon. Merci de me porter dans mon parcours, et d'avoir rendu plus acceptables les sacrifices qu'il a nécessités ; merci de m'accompagner tous les jours dans nos projets, y compris la rédaction de cette thèse, au cours de laquelle tu m'as soutenue et conseillée. A présent, c'est parti pour une nouvelle vie à Bordeaux, que vivent les GI-RON-DINS !

Sommaire

Figures et tableaux	4
Abréviations	6
Introduction.....	9
GENERALITES	10
Chapitre 1 : L'hyperoxalurie primitive de type 1	11
I- Physiopathologie et présentation clinique	11
II- Traitements actuels et perspectives.....	13
Chapitre 2 : La thérapie génique	15
I- Définition et émergence du concept	15
II- Introduction des acides nucléiques dans les cellules cibles.....	16
II- 1 Choix des cibles cellulaires de thérapie génique.....	16
II- 2 Choix du mode d'administration des produits de thérapie génique.....	18
II- 3 La pénétration intracellulaire des acides nucléiques	20
II- 3.1 Techniques physico-chimiques par transfert direct.....	20
II- 3.2 Vectorisation et transfert d'acides nucléiques	21
II- 3.2.1 Vecteurs viraux	22
II- 3.2.1.1 Vecteurs non intégratifs	24
II- 3.2.1.1.1 Vecteurs adénoviraux	25
II- 3.2.1.1.2 Vecteurs viraux associés aux adénovirus.....	28
II- 3.2.1.2 Vecteurs intégratifs.....	29
II- 3.2.1.2.1 Vecteurs rétroviraux.....	30
II- 3.2.1.2.2 Vecteurs lentiviraux	35
II- 3.2.2 Vecteurs non viraux	38
II- 3.2.2.1 Vecteurs plasmidiques et artificiels.....	38
II- 3.2.2.1.1 Vecteurs plasmidiques	38
II- 3.2.2.1.2 Chromosomes artificiels	39
II- 3.2.2.2 Vecteurs chimiques	41
II- 3.2.2.2.1 Vecteurs lipidiques	42
II- 3.2.2.2.2 Vecteurs polymériques	43

II- 3.2.2.2.3 Vecteurs polysaccharidiques (Chitosan)	45
II- 3.2.2.3 Intégration génomique des vecteurs non viraux.....	45
II- 3.2.2.3.1 Présentation des TALENs.....	48
II- 3.2.2.3.2 Présentation des systèmes CRISPR/Cas	50
III- Outils et approches de correction génique	54
III- 1. Approches de modification des séquences génomiques	54
III- 1.1 Thérapie génique additive	54
III- 1.2 Correction génique <i>in situ</i> de mutations ponctuelles.....	55
III- 1.3 Interruption de la séquence d'un gène par introduction de mutations : méthode du <i>knocking out</i>	56
III- 2 Approches de modulation de l'expression génomique	57
III- 2.1 Réduction (ou <i>knocking down</i>) de l'expression génique par interférence à ARN. 57	
III- 2.2 Saut d'exon	59
III- 2.3 <i>Trans</i> -lecture de codon stop prématuré.....	62
III- 2.4 <i>Trans</i> -épissage	63
IV- Aspects réglementaires.....	64
IV- 1 Réglementation des médicaments de thérapie innovante.....	64
IV- 2 Cas particulier des médicaments de thérapie génique : les OGM	66
ETUDES EXPERIMENTALES	67
Chapitre 1 : Introduction et Contexte des travaux.....	68
I- Structuration de l'équipe de recherche.....	68
II- Emergence du projet dans un contexte de traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1 par thérapie génique	68
I- 1 Choix de la stratégie développée.....	68
I- 2 Correction génique ciblée : avantage des cellules iPS	69
III- Structure du projet de recherche	71
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	73
I- Développement des outils de manipulation génétique ciblée	73
I- 1 Correction génique « universelle » à l'aide des TALENs.....	73
I- 1.1 Développement des TALENs	74
I- 1.2 Construction de la cassette de recombinaison	75
I- 1.3 Préparation des plasmides pour l'étape de recombinaison homologue.....	78

I- 2 Correction mutation-spécifique à l'aide des CRISPR/Cas9	79
I- 2.1 Développement du système CRISPR/Cas9.....	79
I- 2.2 Oligodésoxyribonucléotide de recombinaison homologue.....	83
II- Modification du génome cellulaire par recombinaison homologue	84
II- 1 Système TALENs/Cassette de recombinaison homologue.....	84
II- 1.1 Insertion d'une séquence d'ADNc AGXT humain sauvage dans des fibroblastes humains adultes.....	84
II- 1.2 Expression de la cassette de recombinaison dans des cellules HepG2	86
II- 2 Système CRISPR/Cas9/Matrice oligodésoxyribonucléotidique : correction génique ciblée de fibroblastes humains adultes.....	86
Chapitre 3 : Résultats	88
I- Caractérisation des outils de manipulation génique	88
I- 1 Cassette de recombinaison homologue	88
I- 2 Plasmides d'expression des ARN guides.....	89
II- Phénotype cellulaire et toxicité.....	90
III- Discussion.....	91
Conclusion et perspectives.....	95
Bibliographie	96
Annexes.....	113
Résumé.....	117
Serment de Galien	118

Figures et tableaux

Figure 1 : Cartographie des substitutions pathologiques affectant l'enzyme AGT, découvertes chez des patients atteints de PH1

Figure 2 : Métabolisme du glyoxylate dans l'hépatocyte, et conséquences de sa dérégulation dans l'hyperoxalurie primitive de type 1

Figure 3 : Représentation schématique du processus général de la thérapie génique

Figure 4 : Modalités d'administration des produits de thérapie génique

Figure 5 : Emploi des vecteurs dans les essais cliniques de thérapie génique

Figure 6 : Production de vecteurs viraux à l'aide de cellules transcomplémentantes

Figure 7 : Différentes générations de vecteurs adaptés du génome de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5)

Figure 8 : Comparaison génomique AAV sauvage/vecteur dérivé des AAV

Figure 9 : Représentation générale du génome rétroviral

Figure 10 : Modification du génome rétroviral après intégration dans le génome cellulaire

Figure 11 : Production de vecteurs rétroviraux

Figure 12 : Représentation schématique de vecteurs rétroviraux et de leurs modifications, permettant d'améliorer leur sécurité

Figure 13 : Représentation schématique du génome et des vecteurs lentiviraux

Figure 14 : Représentation schématique d'un plasmide pourvu d'un transgène

Figure 15 : Protocole général de développement d'un YAC

Figure 16 : Structure chimique des lipides cationiques communément utilisés en thérapie génique

Figure 17 : Représentation schématique d'un liposome

Figure 18 : Structure chimique des principaux vecteurs polymériques

Figure 19 : Structure chimique du chitosan

Figure 20 : Voies de réparation des cassures double-brins de l'ADN : emplois en modification génique ciblée

Figure 21 : Modèle représentatif de la structure des effecteurs TAL

Figure 22 : Ciblage d'une séquence d'acides nucléiques par les TALENs

Figure 23 : Ciblage de l'ADN par le complexe CRISPR/Cas9

Figure 24 : Programmation de la Cas9 par un ARN guide chimérique

Figure 25 : Biogénèse et fonction cellulaire des miRNAs

Figure 26 : Principe de la technique du saut d'exon

Figure 27 : Mécanisme du trans-épissage

Figure 28 : Représentation de la correspondance entre cassette d'expression et séquence cible, avant recombinaison homologue assistée par les TALENs

Figure 29 : Hybridation des TALENs à leur séquence cible, la région 5'UTR du gène *AGXT* humain

Figure 30 : Etapes de développement de la cassette de recombinaison homologue

Figure 31 : Profils de restriction KpnI/XhoI du plasmide p1180 en fonction de l'insertion du fragment 5'arm homology

Figure 32 : Transformation des nucléases Cas9 en nickases, *via* la mutation D10A

Figure 33 : Développement du plasmide d'expression des ARN guides du système CRISPR/Cas9

Figure 34 : Profils de restriction PmlI/XbaI du plasmide pX462 en fonction de l'insertion des protospacers P42 ou P72

Figure 35 : Culture et sélection des fibroblastes transfectés par le système TALENs/Cassette de recombinaison homologue

Figure 36 : Culture et sélection des fibroblastes transfectés par le système CRISPR/Cas9/Matrice oligodésoxyribonucléotidique

Figure 37 : Profil de restriction KpnI/XhoI du plasmide p1180 5'arm-PGK-Puro-3'arm après migration électrophorétique en gel d'agarose 1,5%

Figure 38 : Profil de restriction du plasmide p1180 5'arm-cDNA *AGXT*-pA BGH-PGK-Puro-3'arm selon les conditions d'hydrolyse, après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%

Figure 39 : Profil de restriction PmlI/XbaI du plasmide pX462 après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%

Tableau 1 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux

Abréviations

AAV : Adeno-Associated Virus
AAVS1 : AAV integration Site 1
Ad : Adenovirus
ADA : Adenosine deaminase
ADN (DNA) : Acide DésoxyriboNucléique (DesoxyriboNucleic Acid)
ADNc (cDNA) : ADN complémentaire (complementary DNA)
AGO : Argonaute
AGT : Alanine Glyoxylate Aminotransférase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARN (RNA) : Acide RiboNucléique (RiboNucleic Acid)
ARNm : ARN messenger
ATP : AdénosineTriPhosphate
BAC : Bacterial Artificial Chromosome
BGH : Bovine Growth Hormone
BMD : Becker Muscular Dystrophy
BPC : Bonnes Pratiques Cliniques
CAR : Cocksackievirus Adenovirus Receptor
CAT : Committee for Advanced Therapies
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
cHS4 : chicken beta-globin 5'-DNase I-Hypersensitive Site 4
CMV : CytoMégaloVirus
CRISPR/Cas : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - associated system
crRNA : crispr RNA
CSH : Cellule Souche Hematopoïétique
dCas9 : deactivated Cas9
DGCR8 : DiGeorge syndrome Critical Region gene 8
DMD : Duchenne Muscular Dystrophy
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSB : Double-Strand Break
EF-1 α : Elongation Factor-1 α
GFP : Green Fluorescent Protein
HAC : Human Artificial Chromosome
HCB : Haut Conseil des Biotechnologies
HDR : Homology-Directed Recombination
HEK : Human Embryonic Kidney

HNSCC : Head And Neck Squamous Cell Carcinoma
 HP1 (PH1) : Hyperoxalurie Primitive de Type 1 (Primary Hyperoxaluria type 1)
 HPRT : Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase
 IDLV : Integrase-Defective Lentiviral Vector
 iPSC : induced Pluripotent Stem Cell
 IRES : Internal Ribosome Entry Site
 ITR : Inverted Terminal Repeat
 KO : knock out
 KRAB : Krüppel-Associated Box
 LB : Lysogeny Broth
 LDH : Lactate DésHydrogénase
 LMO-2 : LIM domain Only 2
 LPLD : Lipoprotein Lipase Deficiency
 LTR : Long Terminal Repeat
 LV : Lentivirus
 MACC1 : Metastasis Associated in Colon Cancer 1
 miRNA : micro RNA
 MLP : Major Late Promoter
 MN : Meganuclease
 MTI : Médicaments de Thérapie Innovante
 NHDF : Normal Human Dermal Fibroblast
 NHEJ : Non-Homologous End-Joining
 NK : Natural Killer (type de lymphocyte)
 NLS : Nuclear Localization Signal
 OGM : Organisme Génétiquement Modifié
 PAC : Phage Artificial Chromosome
 PAM : Protospacer Adjacent Motif
 PAMAM : PolyAMidoAMine
 PBS : Primer Binding Site
 PDMAEMA : Poly[2-(DiMethylAmino) Ethyl MethAcrylate]
 PEI : PolyEthylenImine
 PGK : PhosphoGlycérate Kinase
 PLL : Poly(L-lysine)
 PLP : Pyridoxal 5'-Phosphate
 PTC : Premature Termination Codon
 PTM : Pre-Trans-splicing Molecule
 RAN-GTP : RAs-related Nuclear protein-Guanosine TriPhosphate
 RISC : RNA-Induced Silencing Complex
 RNAi : RNA interference
 RRE : Rev Responsive Element

RV : Retrovirus
RVD : Repeat Variable Diresidue
SA : Splice Acceptor
SD : Splice Donor
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
SKP2 : S-phase Kinase-associated Protein 2
SMaRT : Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing
TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TK : Thymidine Kinase
tracrRNAs : transactivating crispr RNAs
TRBP : TAR (HIV) RNA Binding Protein 2
UTR : UnTranslated Region
VSV-G : Virus de la Stomatite Vésiculaire
WAS(P) : Wiskott-Aldrich Syndrome (Protein)
YAC : Yeast Artificial Chromosome
ZFN : Zinc Finger Nuclease

Introduction

Depuis toujours, l'Homme a cherché des remèdes efficaces contre la douleur et la maladie. La complexité et l'efficacité des traitements disponibles ont évolué parallèlement à sa connaissance du corps humain et des pathologies : s'inspirant dans un premier temps des ressources naturelles, plantes médicinales, tissus animaux et dérivés, il s'est tourné au début du XIX^e siècle vers la chimie de synthèse et d'hémisynthèse. Cela a donné lieu à une première révolution dans la pratique médicale : le développement des antibiotiques, première classe de médicaments capables de traiter la cause d'une pathologie, sans se limiter aux symptômes. Au XX^e siècle, les découvertes de la structure de l'ADN en 1953, et de la technologie de l'ADN recombinant dans les années 1970, ont fondé les bases d'une nouvelle génération de traitements : les médicaments biologiques, ou l'avènement de l'utilisation de l'ADN et des protéines en tant que médicaments.

Cette nouvelle catégorie de médicaments présente un important potentiel d'applications thérapeutiques, allant de la prévention des infections (vaccinologie) aux thérapies anticancéreuses, en passant par le traitement des pathologies d'origine génétique. Ces dernières étant caractérisées dans la plupart des cas par des symptômes multiples et sévères, les traitements symptomatiques parviennent difficilement à soulager les patients. Seule la correction de l'anomalie génétique causale peut permettre d'envisager une amélioration clinique significative et pérenne : tel est l'objectif de la thérapie génique.

Cette voie thérapeutique, qui consiste en l'introduction de séquences d'acides nucléiques dans des cellules afin de modifier leur expression génomique, a déjà fait la preuve de son efficacité dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, pour le traitement de pathologies génétiques d'origines diverses. Dans la présente thèse, qui s'inspire des travaux que j'ai réalisés au cours de mon stage de Master 2, nous proposons de développer le concept de la thérapie génique en application au traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1, pathologie génétique d'origine hépatique présentant des répercussions morbides sur le rein, qui se traduisent principalement par une accumulation de cristaux d'oxalate de calcium responsables d'insuffisance rénale chez les patients.

Dans une première partie dédiée aux généralités, nous étudierons les caractéristiques de l'hyperoxalurie primitive de type 1, en termes moléculaires et cliniques, ainsi que le concept de la thérapie génique, depuis son origine jusqu'à ses applications pratiques, en déclinant les différents modes d'administration et d'action des produits de thérapie génique. Dans une seconde partie, nous aborderons les travaux réalisés en laboratoire, dans le cadre du développement d'un projet de correction génique ciblée de cellules dérivées de patients atteints d'hyperoxalurie primitive de type 1, ainsi que les premiers résultats obtenus et les perspectives du projet de recherche.

GENERALITES

Chapitre 1 : L'hyperoxalurie primitive de type 1

I- Physiopathologie et présentation clinique

Les néphrolithiases regroupent un ensemble de pathologies caractérisées par une accumulation de cristaux insolubles (constitués dans la plupart des cas d'oxalate de calcium) dans le tractus urinaire. Certaines néphrolithiases sont liées à des anomalies métaboliques congénitales ; les répercussions cliniques sont très variables, depuis la formation de cristaux occasionnels éliminés dans les urines jusqu'à l'apparition d'atteintes rénales sévères (Cochat *et al.*, 2010b). Parmi elles, les hyperoxaluries primitives représentent un groupe de maladies congénitales caractérisées par une augmentation de la synthèse et de l'excrétion d'oxalate, suivies par un dépôt de cristaux insolubles d'oxalate de calcium dans les reins et le tractus urinaire (Danpure, 2001).

L'hyperoxalurie primitive de type 1 (ou *Primary hyperoxaluria type 1* « PH1 », MIM 259900) est une pathologie autosomale récessive rare du métabolisme, dont la fréquence est de 1 cas pour 120 000 naissances dans le monde (soit une prévalence de 1,04/million d'habitants) et le sex-ratio M/F est de 1,33. En France, la prévalence de la PH1 est de 1 cas pour 120 000 naissances vivantes. Cette maladie est associée à une oxalose systémique due au déficit fonctionnel d'une enzyme spécifique du peroxyosome des hépatocytes, l'alanine glyoxylate aminotransférase (AGT, EC 2.6.1.44) (Danpure, 2001 ; Société de Néphrologie, consulté le 22.09.15). L'AGT est une protéine composée de 392 acides aminés, de masse relative 43 kD ; elle appartient à la famille « *Fold Type I family of PLP-enzymes* » et fonctionne en homodimère, dont chaque sous-unité contient un site de liaison au pyridoxal 5'-phosphate (PLP ou Vitamine B6), son cofacteur (Zhang *et al.*, 2003). Chaque monomère protéique peut être subdivisé en un large domaine N-terminal (résidus 1 à 282) composé de l'interface de dimérisation et de la plus grande partie du site actif, associé à un domaine C-terminal plus court (résidus 283 à 392) qui contient la totalité des informations nécessaires au ciblage du peroxyosome ainsi qu'un couple de résidus contribuant à la structure du site actif. Les 20 premiers résidus qui composent le large domaine d'un monomère forment un bras N-terminal qui enveloppe la surface du domaine N-terminal de la sous-unité opposée. L'AGT partage cette structure avec certaines « PLP-enzymes » de la même famille (Montioli *et al.*, 2012).

Le gène *AGXT* codant pour l'AGT humaine est situé au locus 2q37.3 ; il comprend 11 exons s'étendant sur environ 10kb (Purdue *et al.*, 1991). De nombreux variants/mutants du gène *AGXT* ont été identifiés chez les patients atteints de PH1 : variants polymorphes, mutations non-sens et faux-sens, mutations des sites d'épissage, délétions et insertions (Williams *et al.*, 2009). Dans le projet expérimental

de la thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement aux mutations faux-sens liées à des substitutions, dont la liste établie à ce jour est présentée en figure 1.

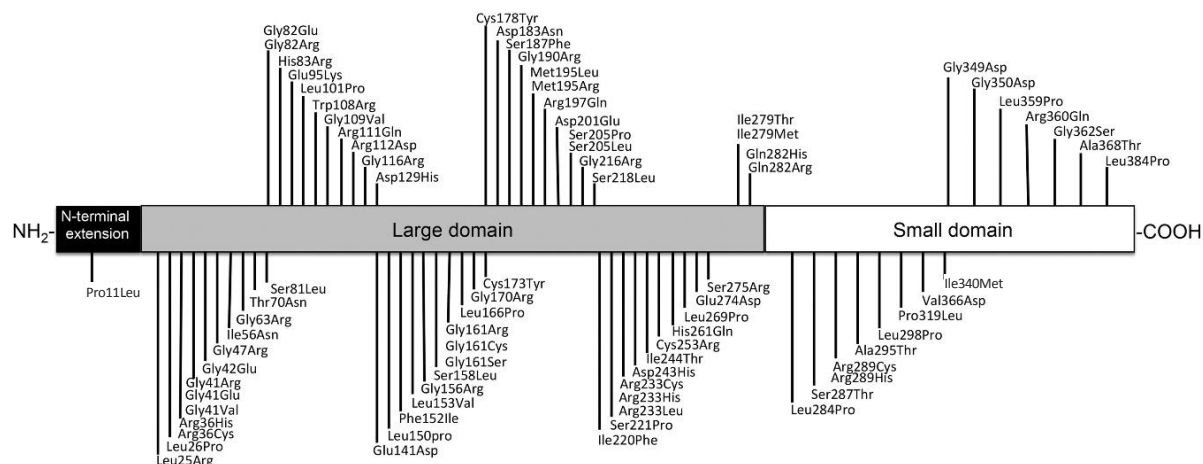


Figure 1 : Cartographie des substitutions pathologiques affectant l'enzyme AGT, découvertes chez des patients atteints de PH1 (d'après Oppici *et al.*, 2015). Les modifications des acides aminés indiquées sont disposées selon la répartition des résidus correspondants au sein des monomères de la protéine AGT.

Chez l'Homme, l'AGT catalyse la transformation irréversible de l'alanine et du glyoxylate en pyruvate et glycine, respectivement, au sein du compartiment peroxysomal des hépatocytes matures.

Dans les hépatocytes des patients atteints de PH1, le glyoxylate n'est pas converti efficacement en glycine par l'AGT ; il est alors oxydé en oxalate par la lactate déshydrogénase, conduisant à une hyperoxalémie et une hyperoxalurie. Chez les êtres humains, l'oxalate ne peut pas être métabolisé (on parle d'impasse métabolique) et son excrétion urinaire est associée à une accumulation progressive de cristaux d'oxalate de calcium insolubles dans le rein et le tractus urinaire. Ces dépôts conduisent à l'apparition de néphrolithiases (présence de « calculs » ou cristaux d'oxalate de calcium dans le rein), néphrocalcinoses (dépôts d'oxalate de calcium dans le parenchyme rénal), dommages tissulaires systémiques et perte de fonction rénale (Hoppe *et al.*, 2009) (Figure 2).

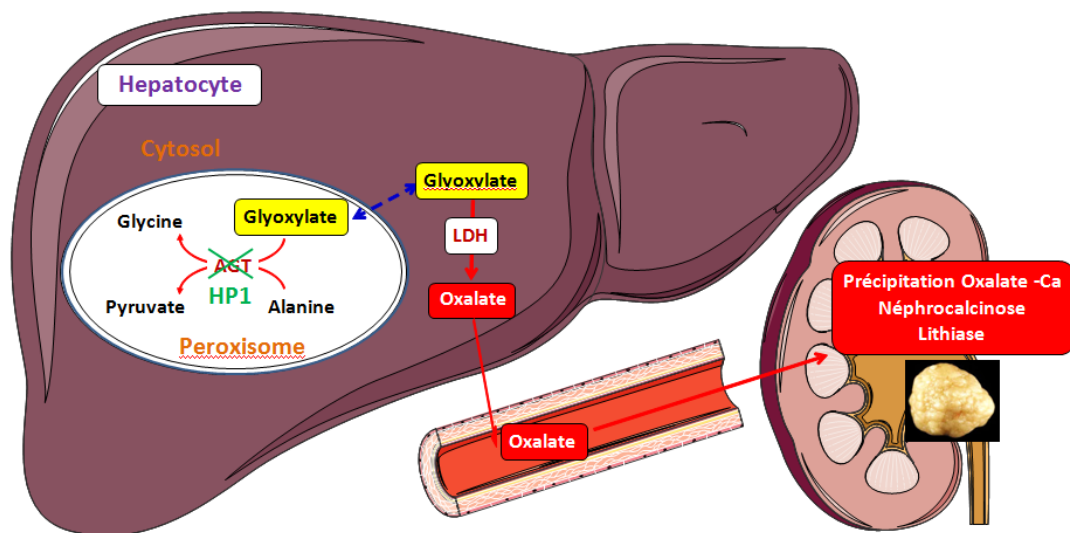


Figure 2 : Métabolisme du glyoxylate dans l'hépatocyte, et conséquences de sa dérégulation dans l'hyperoxalurie primitive de type 1 (schémas des structures anatomiques dérivés de la Banque d'images PowerPoint de Servier, consultée le 14.10.15). AGT : alanine glyoxylate aminotransférase ; HP1 : hyperoxalurie primitive de type 1 ; LDH : lactate déshydrogénase.

L'hyperoxalurie primitive de type 1 est généralement diagnostiquée dans l'enfance : elle se manifeste dans la majorité des cas par une lithiase rénale, révélée par des douleurs abdominales, des hématuries et/ou une infection urinaire. L'échographie rénale, systématique devant ces symptômes, permet d'identifier la présence de néphrocalcinoses et de néphrolithiases. En complément du diagnostic clinique, différents paramètres biologiques sont mesurés : la cristallurie (cristaux d'oxalate de calcium monohydratés), l'oxalurie et l'oxalémie. Enfin, le diagnostic de certitude correspond à l'étude des mutations du gène *AGXT*, ou génotypage (Cochat P., consulté le 23.09.15 ; Société de Néphrologie, consulté le 22.09.15).

Si la prise en charge de la pathologie est insuffisante pour ralentir sa progression, l'évolution de la PH1 se traduit par une oxalose systémique, conduisant à des manifestations cliniques telles que des anomalies de conduction cardiaque, une calcification vasculaire avec gangrène distale, un trouble de la vision, des nodules cutanés et une atteinte ostéo-articulaire (Orphanet, consulté le 23.09.15).

II- Traitements actuels et perspectives

Des stratégies conduisant à une réduction de la production d'oxalate ou à une dégradation de l'oxalate en excès peuvent être bénéfiques en vue du traitement de la PH1. Cependant, il a été estimé qu'une correction équivalente à plus de 75% de la masse totale du foie des patients est nécessaire pour diminuer la production d'oxalate en-dessous du seuil cristallogène.

Dans l'objectif de ralentir la progression de la PH1, des traitements symptomatiques peuvent être envisagés, tels qu'une hyperdiurèse, un régime à faible

apport en oxalate (réduction de l'ingestion de chocolat, épinards, rhubarbe, vitamine C), et l'utilisation d'inhibiteurs de la cristallisation (citrate de potassium, magnésium).

En terme curatif, le traitement le plus efficace actuellement disponible correspond à la greffe hépatorénale allogénique, qui constitue une thérapie de remplacement en restaurant l'activité hépatique de l'AGT (Bergstralh *et al.*, 2010 ; Cochat *et al.*, 2010a). Cependant, cette voie thérapeutique est sujette à d'importants facteurs de variabilité (âge du patient, dialyse) et est limitée par la disponibilité de greffons compatibles, une morbidité et une mortalité significatives, ainsi que la nécessité à long terme d'agents immunosuppresseurs.

Une alternative intéressante correspond à la transplantation d'hépatocytes autologues génétiquement corrigés, levant les questions de disponibilité et de morbidité liées à la greffe hépatique orthotopique. Cependant, le manque de systèmes de cultures cellulaires efficaces pour amplifier et maintenir *in vitro* des hépatocytes matures, totalement différenciés, constitue un obstacle majeur pour les recherches concernant le traitement des maladies hépatiques (Puppi *et al.*, 2011). De plus, la question du mode de correction des cellules est à considérer. En effet, si la mise en place d'un traitement pharmacologique est envisageable chez certains patients, *via* un supplément en vitamine B6 qui favorise l'activité résiduelle des enzymes AGT (formes « vitamino-sensibles ») ou l'apport de molécules chimiques chaperonnes telles que la bétaine (substance végétale extraite de la betterave) qui augmente la solubilité des protéines mutées et réduit leur tendance à former des agrégats inactifs (Santana *et al.*, 2003), seule la correction de l'anomalie génétique peut conduire à une amélioration clinique pérenne.

Chapitre 2 : La thérapie génique

I- Définition et émergence du concept

La thérapie génique peut être définie comme un ensemble de stratégies permettant de délivrer des acides nucléiques (ADN ou ARN) au sein de cellules spécifiques, dans l'objectif de modifier l'expression génique d'un individu afin de traiter une pathologie déterminée. Elle appartient au domaine de la recherche biomédicale visant à traiter directement les causes des pathologies d'origine génétique (Jones *et al.*, 2015 ; ASGCT - American Society of Gene & Cell Therapy, consulté le 06.08.2015) (Figure 3). La thérapie génique se distingue donc des approches médicales traditionnelles qui, à l'exception des antibiotiques, sont destinées à traiter uniquement les symptômes d'une maladie.

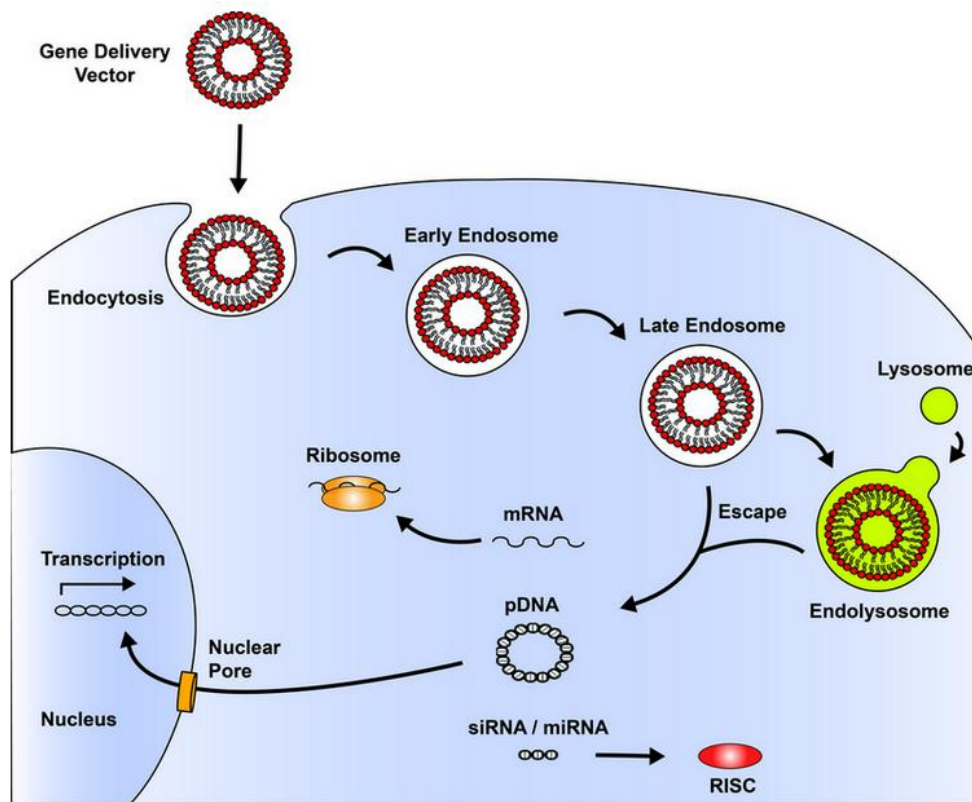


Figure 3 : Représentation schématique du processus général de la thérapie génique (Jones *et al.*, 2015). Exemple de délivrance des acides nucléiques par des vecteurs non viraux. Après franchissement de la membrane cytoplasmique, les séquences d'acides nucléiques sont libérées dans le cytoplasme cellulaire. Les séquences d'ARN restent dans le cytoplasme où elles peuvent être traduites en protéines par les ribosomes, ou incorporées dans le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) afin d'interférer avec l'expression du génome cellulaire. Quant aux séquences d'ADN, leur expression nécessite le passage de la membrane nucléaire afin d'atteindre le noyau, où elles peuvent s'intégrer ou non au sein du génome de la cellule hôte. L'ensemble des notions évoquées sera décrit dans la suite de la thèse.

Historiquement, le concept de thérapie génique puise son origine dans la découverte de la technologie de l'ADN recombinant dans les années 1970, qui a permis aux scientifiques d'accéder à une meilleure connaissance du génome, et d'envisager sa manipulation. Il a ainsi été possible d'isoler les gènes, de caractériser leur expression, et d'identifier des mutations impliquées dans les pathologies humaines. Un exemple d'avancée marquante de « l'ère génomique » correspond au séquençage du génome humain, achevé en avril 2003 (Gros F, 2015 ; *Site du Genoscope*, consulté le 10.08.15).

Après avoir entrepris avec succès l'exploration du fonctionnement et des dysfonctionnements du génome, la communauté scientifique s'est tournée vers une application clinique de ces connaissances et technologies nouvelles, présentant un potentiel significatif dans le traitement des pathologies d'origine génétique. Si dans un premier temps, la thérapie génique a été envisagée pour pallier un gène déficient afin d'en restaurer la fonction, dans le cas de patients inéligibles à la greffe allogénique de cellules ou de tissus fonctionnels, aujourd'hui le concept dépasse largement ce cadre et d'autres fonctions sont exploitées : apport d'un gène suicide en cancérologie, induction de la prolifération des vaisseaux (maladies vasculaires) (Richard, 2003).

Après avoir étudié les différents modes de délivrance des acides nucléiques thérapeutiques au sein des cellules, nous nous intéresserons aux différents outils disponibles pour modifier l'expression génique d'un individu, pour finalement définir la réglementation s'appliquant aux produits de thérapie génique et les contraintes inhérentes.

II- Introduction des acides nucléiques dans les cellules cibles

II- 1 Choix des cibles cellulaires de thérapie génique

Les organismes eucaryotes sont constitués de deux grandes catégories de cellules : les cellules somatiques (non reproductives) et les cellules germinales (nécessaires à la reproduction sexuée). De façon pratique, il est envisageable de corriger génétiquement les cellules appartenant à ces deux catégories. Cependant, les modifications génomiques réalisées au sein des cellules germinales d'un individu sont transmises à sa descendance, et sont constitutives de l'ensemble des cellules des organismes appartenant à cette descendance (*Gene Therapy Net*, consulté le 31.07.15).

Ce type de modification génique, offrant une correction permanente et transmissible, présente un intérêt significatif pour l'industrie agroalimentaire : mise au point de lignées de plantes adaptées à la culture en conditions hostiles, et de cheptels à hauts rendements de production, par exemple. En ce qui concerne l'Homme, la thérapie génique germinale pourrait permettre d'envisager l'éradication de pathologies génétiquement transmissibles chez des familles porteuses de gènes

morbides, et à terme, faire disparaître ces pathologies de la population mondiale. Cependant, cette voie thérapeutique soulève des controverses : elle est ainsi considérée comme hérétique par certaines personnes car « allant contre nature », tandis que d'autres émettent des réticences vis-à-vis des conséquences inattendues et potentiellement néfastes de la transmission des gènes corrigés aux générations futures (*Gene Therapy Net*, consulté le 31.07.15).

Ainsi, chez l'être humain, seule la thérapie génique effectuée sur des cellules somatiques est autorisée, comme cela est mentionné dans la réglementation européenne (Partie IV de l'Annexe I de la Directive 2003/63/EC relative aux médicaments à usage humain, qui modifie la directive 2001/83/EC ; voir sous-partie « Aspects réglementaires »). Les conséquences de cette stratégie thérapeutique se limitent à l'individu traité, ce qui améliore leur contrôle ; cependant, les cellules somatiques se caractérisant par une durée de vie brève, des administrations répétées du produit de thérapie génique sont nécessaires au maintien de l'effet tout au long de la vie du patient.

Afin de réduire le nombre d'administrations, il est possible de traiter des cellules plus immatures que les cellules somatiques différenciées : les cellules souches somatiques. Si la correction des cellules souches embryonnaires « pluripotentes » (capables de se différencier en tout type cellulaire issu de chacun des trois feuillets embryonnaires mésodermique, endodermique et ectodermique) est interdite, car elle conduit à la transmission de cette correction au sein des cellules germinales, en revanche la modification génique des cellules souches somatiques « multipotentes » est autorisée. Ces dernières apparaissent après la phase de gastrulation (formation des feuillets embryonnaires) chez l'embryon, et un faible pourcentage de ces cellules persiste chez l'adulte ; elles sont incapables de se différencier en cellules germinales, mais il est en revanche possible de les orienter vers différentes lignées cellulaires matures issues d'un même feuillet (celui dont dérivent les cellules souches elles-mêmes). La correction génique d'une cellule souche somatique assure la présence de cette modification dans le génome de toutes ses cellules filles, ce qui permet de s'affranchir de la répétition de l'administration du produit de thérapie génique durant toute la vie de l'individu affecté (Larson and Cohen, 2000). Cette stratégie est fréquemment utilisée au cours d'études visant à développer des traitements pour des pathologies sanguines et immunitaires d'origine génétique : les cellules initialement corrigées correspondent aux cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes, multipotentes et spécifiques du tissu sanguin. Après introduction des CSH génétiquement modifiées dans l'organisme des patients, celles-ci sont capables de se différencier en cellules lymphoïdes (lymphocytes B et T) et myéloïdes (granulocytes, monocytes, érythrocytes, thrombocytes) porteuses de la modification ; des résultats positifs ont notamment été obtenus chez l'Homme dans le traitement du syndrome de Wiskott-Aldrich (déficit immunitaire primitif lié au chromosome X, consécutif au

dysfonctionnement du gène *WAS* codant pour la protéine WASP, régulatrice du cytosquelette d'actine) (Boztug *et al.*, 2010) et de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (pathologie cérébrale se traduisant par une démyélinisation progressive, causée par le dysfonctionnement du gène *ABCD1* codant pour la protéine du même nom, qui correspond à un transporteur cellulaire se liant à l'ATP) (Cartier *et al.*, 2009).

Il est également envisageable de pratiquer la thérapie génique au sein de cellules souches somatiques multipotentes fœtales, *in utero*. Cette approche présente deux avantages majeurs : le nombre de cellules souches somatiques disponibles chez le fœtus est plus important que chez l'adulte, et l'état immature du système immunitaire fœtal réduit sa sensibilité aux séquences nucléotidiques exogènes, ce qui diminue le risque de réponse immunitaire liée à l'administration du traitement (Chauhan *et al.*, 2004 ; Larson and Cohen, 2000). Si des approches de thérapie génique *in utero* ont été réalisées avec succès dans des modèles animaux, conduisant par exemple à la réversion du phénotype de fibrose kystique ou mucoviscidose (pathologie pulmonaire caractérisée par une accumulation de mucus dans les voies respiratoires, consécutive à une mutation du gène *CFTR* ou *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* codant pour un transporteur cellulaire d'ions chlorures) chez la souris (Larson *et al.*, 1997), de nombreuses étapes (dont la mise au point du protocole d'administration) restent à maîtriser avant d'envisager une application clinique.

II- 2 Choix du mode d'administration des produits de thérapie génique

L'administration des produits de thérapie génique peut s'effectuer selon deux voies distinctes, *in vivo* et *ex vivo*, choisies en fonction des caractéristiques du produit et des cellules cibles, et selon les indications de la stratégie et les objectifs thérapeutiques à atteindre (Figure 4).

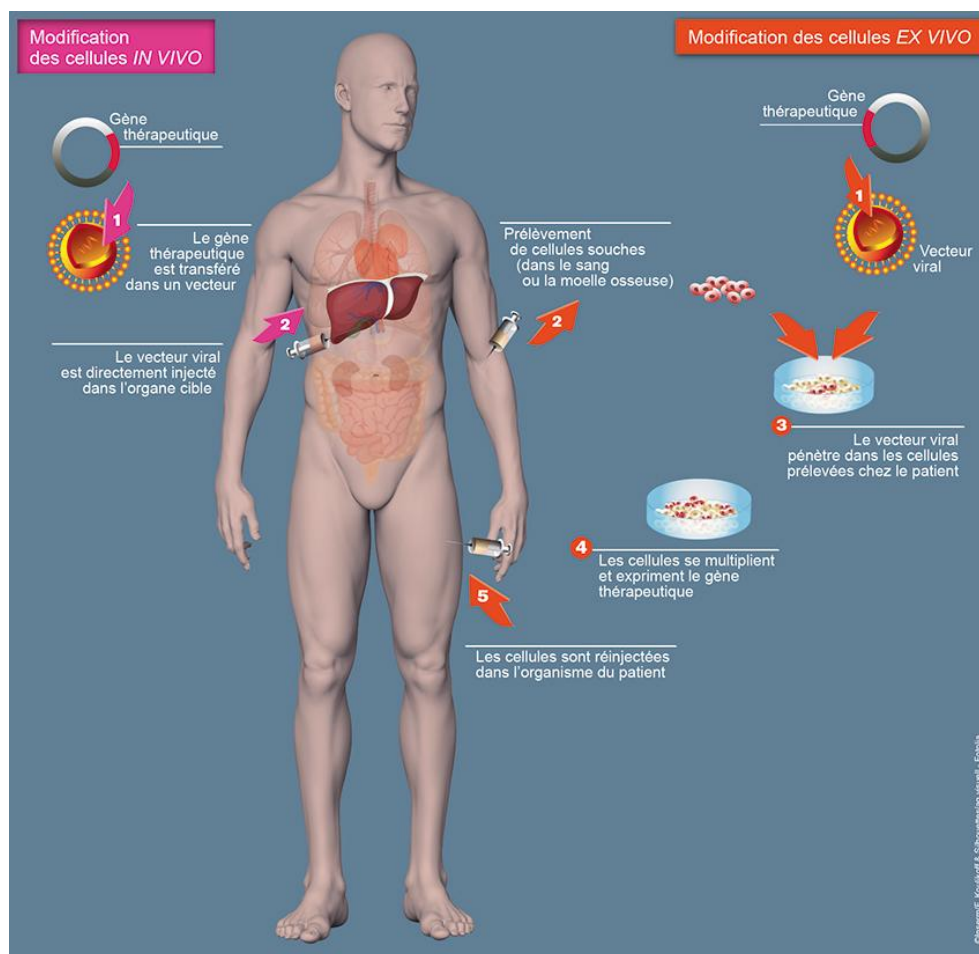


Figure 4 : Modalités d'administration des produits de thérapie génique (Inserm – Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, consulté le 14.10.15). A gauche : *in vivo*, le vecteur de thérapie génique est directement injecté dans l'organisme du patient à traiter. A droite : *ex vivo*, le vecteur est introduit dans des cellules en culture prélevées chez le patient, qui sont finalement réintroduites chez le donneur après caractérisation de la correction recherchée. Seules des méthodes de thérapie génique virale sont indiquées ici, mais les mêmes stratégies sont employées lors de l'utilisation de vecteurs non viraux (voir paragraphes dédiés).

La thérapie génique *ex vivo* permet de modifier une population cellulaire précise, et de caractériser les modalités d'expression du *transgène* (séquence nucléotidique exogène responsable de l'effet de la thérapie génique) et de persistance du vecteur au sein des cellules (intégration génomique ou non, sites d'intégration et séquences des fragments intégrés).

Cependant, il n'est pas toujours possible de prélever les cellules à corriger : l'administration du vecteur ne peut pas être réalisée *ex vivo* lorsqu'il s'agit de modifier des cellules cardiaques ou des neurones, par exemple. Il est alors envisageable d'injecter le vecteur contenant le transgène directement dans les organes cibles, *in vivo* ; des protocoles empruntant cette voie d'administration ont notamment été développés dans le cas de l'amaurose congénitale de Leber (dystrophie héréditaire sévère de la rétine entraînant une diminution précoce et

progressive de la vision, jusqu'à la cécité), où l'injection du vecteur contenant le transgène se fait directement dans la rétine (Maguire *et al.*, 2009). Cette seconde stratégie expose le patient à une dissémination du transgène plus aléatoire, bien que de nombreuses stratégies soient maintenant mises en œuvre afin de cibler et de contrôler l'effet du transgène (voir sous-partie « Vectorisation et transfert d'acides nucléiques »), et elle nécessite un suivi du patient à long terme afin de s'assurer de la bonne maîtrise des effets de la thérapie.

En 2006, la mise au point des cellules souches pluripotentes induites ou iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2007) a révolutionné la thérapie génique *ex vivo*. Ces cellules résultent de la reprogrammation de cellules somatiques différenciées vers un stade plus immature, pluripotent ; les cellules souches obtenues peuvent ensuite être orientées vers une lignée cellulaire choisie, qui peut être différente du type cellulaire dont dérivent les iPSCs. Ce mode de thérapie génique permet ainsi d'allier un contrôle exhaustif de la correction génétique présente au sein des cellules souches induites, et de les différencier en cellules injectées au sein d'organes jusqu'alors inaccessibles par la voie *ex vivo*, tels que le cœur (Inserm – Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, consulté le 14.10.15). C'est cette approche thérapeutique qui est envisagée dans le cadre du projet de traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1, que je développerai dans la seconde partie de cette thèse.

II- 3 La pénétration intracellulaire des acides nucléiques

L'un des aspects critiques du processus de thérapie génique correspond au choix du mécanisme de libération des acides nucléiques au sein des cellules, qui influence significativement la durée et l'issue du traitement. En effet, pour exercer leur effet thérapeutique, les acides nucléiques doivent à la fois être capturés par les cellules et transloqués sur leur site d'action (le plus souvent, l'ADN est transporté dans le noyau et l'ARN dans le cytoplasme). Ce processus constitue une étape délicate à maîtriser car il nécessite le franchissement des membranes cellulaires (constituées d'une bicouche lipidique chargée négativement) réfractaires au passage des acides nucléiques (polyanions hautement chargés) (Jones *et al.*, 2015 ; Richard, 2003). L'emploi de techniques facilitant la pénétration des acides nucléiques est donc nécessaire à leur libération intracellulaire.

II- 3.1 Techniques physico-chimiques par transfert direct

Dans un premier temps, les techniques développées ont consisté à augmenter la perméabilité des membranes, selon différents principes physico-chimiques.

Parmi ces méthodes, celle qui est actuellement la plus utilisée correspond à l'électroporation. Elle consiste à appliquer une brève impulsion électrique à une suspension cellulaire, ce qui induit une différence de potentiel à la membrane et provoque l'ouverture de pores membranaires (Kotnik *et al.*, 2015). C'est une méthode

rapide, utilisable chez les cellules procaryotes et eucaryotes, mais qui entraîne une importante mortalité cellulaire (Cao *et al.*, 2010).

Une seconde technique très répandue consiste à complexer les acides nucléiques avec des molécules chimiques chargées positivement, telles que le phosphate de calcium, afin de neutraliser les charges négatives (Mostaghaci *et al.*, 2015).

Enfin, deux autres méthodes, plus spécifiques, peuvent être employées pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. La microinjection d'une part, consiste en l'injection de matériel directement dans le cytoplasme ou le pronoyau d'une cellule juste fécondée ; elle est particulièrement utilisée pour l'obtention d'animaux transgéniques, où les acides nucléiques sont injectés au sein de pronoyaux fécondés qui sont ensuite greffés dans des femelles adoptives pseudo-gestantes (Nakagawa *et al.*, 2015). La biolistique d'autre part, correspond à une méthode de choix pour faciliter le passage de la paroi pectocellulosique végétale (Sabatino *et al.*, 2015 ; Jinkerson and Jonikas, 2015) ; la technique consiste en une propulsion d'acides nucléiques (adsorbés sur des particules d'or ou de tungstène) directement sur les cellules, sous pression d'hélium.

Si ces techniques sont simples et pour la plupart peu coûteuses, elles se caractérisent par deux inconvénients majeurs : une faible efficacité de transfert, et des difficultés d'application *in vivo*. Cela a conduit les scientifiques à développer de nouvelles approches pour faciliter le transfert de matériel génétique, consistant en une « vectorisation » des acides nucléiques (Richard, 2003).

II- 3.2 Vectorisation et transfert d'acides nucléiques

Les « vecteurs » d'acides nucléiques peuvent être considérés comme des transporteurs : à l'instar des techniques précédemment évoquées, ils facilitent le passage du matériel génétique à travers les membranes cellulaires, mais ils jouent en outre un rôle de protection de ce matériel face aux composants cellulaires susceptibles de le dégrader (nucléases, lysosome), et certains sont même capables de favoriser significativement l'intégration des acides nucléiques au sein du génome cellulaire.

Afin d'être efficace dans le traitement de pathologies d'origine génétique, un vecteur de thérapie génique doit idéalement répondre à plusieurs spécifications : 1) la sécurité, qu'il est plus facile d'assurer à l'aide de vecteurs non intégratifs qui évitent tout risque de mutagénèse insertionnelle ; 2) une capacité de production à grande échelle, de façon simple et à moindre coût ; 3) une stabilité au sein des cellules cibles, ce qui implique une faible tendance à induire des réponses immunitaires ; 4) une importante capacité d'encapsulation, autorisant l'introduction de transgènes caractérisés par de longues séquences nucléotidiques, tels que des gènes et éléments de régulation de leur expression (promoteurs, enhancers, séquences insulatrices) (Alba *et al.*, 2005).

Afin de répondre à ces exigences, et s'adapter au mieux aux stratégies thérapeutiques développées, différentes catégories de vecteurs peuvent être employées (Figure 5).

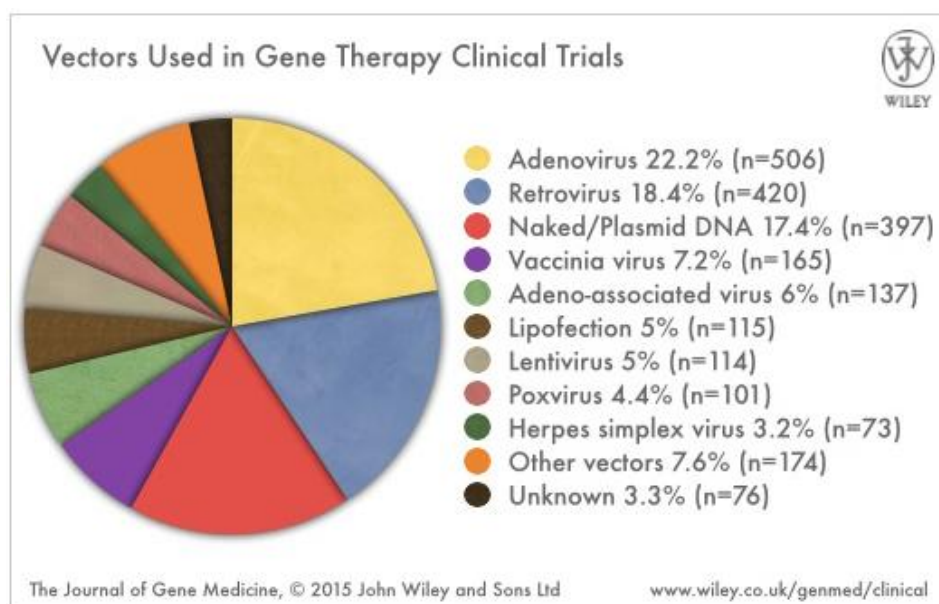


Figure 5 : Emploi des vecteurs dans les essais cliniques de thérapie génique (Wiley J and Sons Ltd., consulté le 31.07.15). Le graphique prend en considération l'ensemble des essais cliniques de thérapie génique répertoriés en juillet 2015. On peut considérer que la répartition de l'emploi des vecteurs dans les essais cliniques reflète celle des projets de recherche en thérapie génique.

Comme le montre la figure 5, les vecteurs de thérapie génique sont répartis en deux catégories : viraux et non viraux (ou synthétiques). Si les technologies non virales se caractérisent par une flexibilité supérieure, ainsi qu'une cytotoxicité et une immunogénicité plus faibles que les vecteurs viraux, leur manque d'efficacité dans le franchissement des barrières cellulaires ne leur a pas permis dans un premier temps d'atteindre des résultats cliniques équivalents aux vecteurs viraux, ce qui a conduit à un désintérêt vis-à-vis de ces techniques. Cependant, des avancées récentes en termes de technologies des vecteurs et de chimie des acides nucléiques ont modifié les connaissances des systèmes non viraux, laissant envisager une importance nouvelle de ces systèmes dans le domaine de la thérapie génique (Jones *et al.*, 2015).

Les paragraphes suivants proposent une description des différents types de vecteurs employés dans les protocoles de thérapie génique en développement, ainsi que des exemples d'applications des technologies utilisées.

II- 3.2.1 Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux peuvent être définis comme des virus modifiés génétiquement afin de transférer et d'exprimer leurs propres gènes ou des gènes étrangers. Ils sont principalement employés pour transférer du matériel génétique au sein de cellules, telles que les cultures de cellules primaires, difficiles à transfecter à

l'aide des autres méthodes disponibles ; ils sont également très utiles aux projets nécessitant une expression importante et/ou une introduction stable du transgène au sein du génome cellulaire (Koontz, 2013). Ces vecteurs conservant leur pouvoir naturel de franchissement des barrières cellulaires, ils ne nécessitent l'assistance d'aucune technique physico-chimique précédemment décrite.

Différents types de vecteurs viraux peuvent être utilisés (Figure 5), choisis en fonction de la conformité de leurs caractéristiques avec les spécifications des stratégies développées. Cependant, dans tous les cas, les vecteurs utilisés font l'objet d'une ingénierie importante pour annuler leur potentiel toxique et, lorsque cela est nécessaire, pour diminuer leur immunogénicité afin de permettre une correction thérapeutique à long terme.

Dans cet objectif, l'ensemble des vecteurs viraux employés dans des protocoles de thérapie génique présente une caractéristique commune : l'absence de potentiel répliquatif. Cela résulte d'une délétion des gènes responsables de la réplication des virus sauvages, qui rend les virus défectifs et permet de réduire les risques liés à une dissémination virale non contrôlée. La production de ces particules virales défectives s'effectue alors au sein de cellules « transcomplémentantes », qui possèdent les gènes supprimés des virus sauvages (intégrés à leur génome ou présents sous forme plasmidique épisomale) et codent pour les protéines correspondantes. Les particules virales peuvent ainsi se développer à l'intérieur des cellules transcomplémentantes à l'aide de l'ensemble des protéines nécessaires à leur formation, mais elles sont incapables d'exprimer elles-mêmes ces protéines et donc de se multiplier en-dehors de cet environnement (Figure 6).

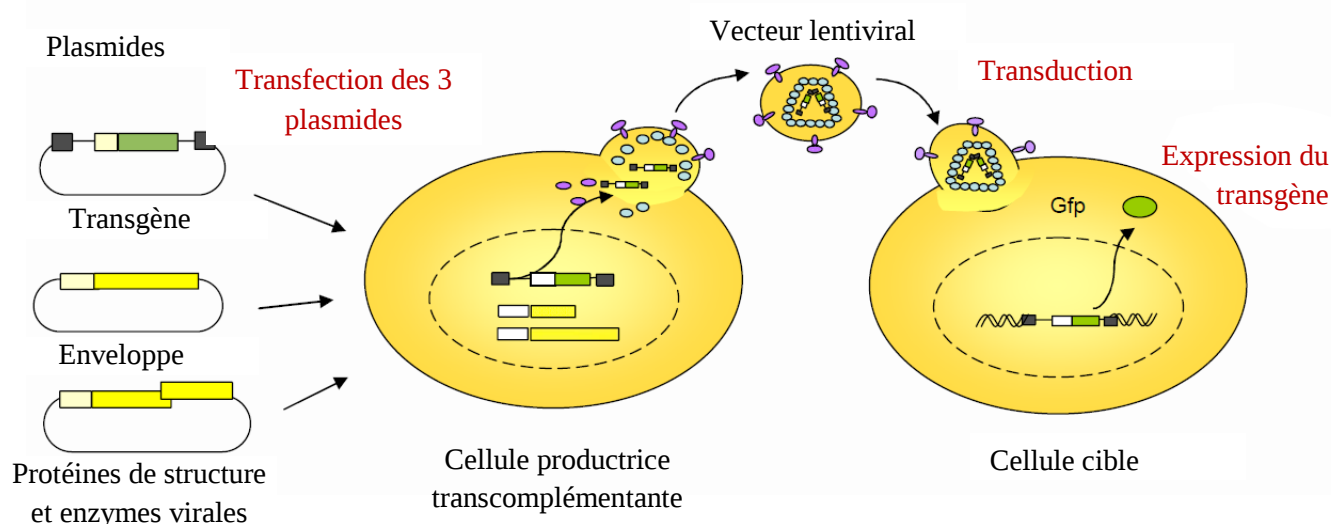


Figure 6 : Production de vecteurs viraux à l'aide de cellules transcomplémentantes (d'après une figure créditée par Mme Lyse Rivière, ENS Lyon). Exemple de vecteurs lentiviraux (voir paragraphe dédié). Comme le montre la figure, la transfection des 3 plasmides dans la cellule productrice de vecteurs viraux permet la formation de particules contenant toutes les protéines virales présentes chez le virus sauvage (codées par les plasmides « Enveloppe » et « Protéines de structure et enzymes viraux »), alors que le génome encapsidé dans les particules lentivirales code uniquement pour le transgène. Les cellules cibles transduites ensuite par les vecteurs expriment donc seulement le transgène (ici la protéine exprimée est la GFP, *Green Fluorescent Protein*).

Les paragraphes suivants présentent les 4 types de vecteurs viraux les plus utilisés en thérapie génique chez l'Homme. Ils peuvent être distingués en deux grandes catégories : vecteurs non intégratifs (adénoviraux et viraux associés aux adénovirus) et intégratifs (rétroviraux et lentiviraux).

Le tableau 1 donne un aperçu de leurs caractéristiques principales, qui seront détaillées par la suite.

Vecteur Caractéristiques	Adénoviral	Viral associé aux adénovirus	Rétroviral	Lentiviral
Génome (type et taille)	ADN linéaire bicaténaire 36 kb	ADN linéaire monocaténaire 4,7 kb	2x ARN linéaire monocaténaire, polarité + 7 à 12 kb	2x ARN linéaire monocaténaire, polarité + 8 à 10 kb
Taille des particules virales	80 nm	20 nm	100 nm	100 nm
Enveloppe	Non	Non	Oui	Oui
Taille maximale du transgène (kb)	8 à 36	5	8	8
Cellules transduites	Quiescentes/ En division	Quiescentes/ En division	En division	Quiescentes/ En division
Réponse immunitaire	Oui	Non	Non	Non
Risque	Réaction inflammatoire	Non identifié	Intégration/ Mutagénèse	Intégration/ Mutagénèse
Expression du transgène	Transitoire en l'absence d'immunosuppression	Stable (surtout dans les cellules quiescentes)	Stable (intégration génomique)	Stable (intégration génomique)

Tableau 1 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux (d'après Ponder, 2001 ; Salido *et al.*, 2011).
En ce qui concerne la taille maximale du transgène encapsidable au sein des vecteurs adénoviraux, celle-ci varie en fonction de la génération des vecteurs considérés (voir paragraphe dédié).

II- 3.2.1.1 Vecteurs non intégratifs

Les vecteurs non intégratifs sont incapables d'insérer leur génome au sein de celui de leurs cellules hôtes ; celui-ci persiste donc de façon épisomale dans la cellule. Cette caractéristique rend complexe l'utilisation des vecteurs non intégratifs dans des cellules en division, car elle se traduit par la perte progressive du matériel transgénique au cours des mitoses. En revanche, lorsqu'il s'agit de faire pénétrer un transgène dans des cellules qui ne se divisent pas, les vecteurs non intégratifs sont favorisés car ils sont considérés comme plus sûrs que les vecteurs intégratifs, qui exposent les cellules hôtes à des insertions délétères et transmissibles (voir paragraphes dédiés).

Parmi les vecteurs non intégratifs, les vecteurs dérivés des adénovirus ont été dans un premier temps privilégiés, mais leur tendance à déclencher des réactions immunitaires *in vivo* a contribué à réduire leur emploi dans le traitement des pathologies d'origine génétique ; ils restent cependant des vecteurs de choix en immunothérapie contre le cancer. La diminution de l'utilisation des vecteurs

adénoviraux a laissé place à l'émergence de vecteurs dérivés de virus associés aux adénovirus. S'ils présentent une faible capacité de vectorisation en termes de taille des séquences transportées, leur intérêt réside en l'absence de pathologie associée aux virus sauvages, et en leur caractère peu inflammatoire.

Les paragraphes suivant proposent une description de ces vecteurs, ainsi que des exemples d'application en thérapie génique.

II- 3.2.1.1.1 Vecteurs adénoviraux

Les adénovirus (Ad) appartiennent à la famille des *Adenoviridae*. Ce sont des virus non enveloppés à ADN linéaire bicaténaire (taille du génome : 36 kb), d'un diamètre de 70 à 90 nm. Leur capside présente des fibres pourvues de boutons terminaux, eux-mêmes composés d'hémagglutinine capable de se lier à de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire du récepteur CAR (*Coxsackievirus Adenovirus Receptor*) ; les adénovirus présentent donc un tropisme cellulaire large. Ces virus présentent une distribution mondiale, et les infections humaines sont fréquentes : elles sont estimées à 10/vie, et 51 sérotypes, définis par les anticorps induits lors d'une infection virale, ont été identifiés chez l'Homme. Si ces infections sont peu symptomatiques chez les individus immunocompétents (rhume, conjonctivite), elles sont en revanche beaucoup plus sévères chez les immunodéprimés, pouvant alors être responsables de pneumopathies fébriles (Sinclair *et al.*, 2009).

Les séquences génomiques des adénovirus sont réparties en deux catégories : d'une part, les séquences E1, E2A et B, E3 et E4 qui codent pour des protéines dites « précoces » (produites lors de la phase précoce du cycle viral) impliquées dans la réplication virale, et d'autre part, les séquences L1, L2, L3, L4 et L5 qui codent pour des protéines dites « tardives » nécessaires à la structure des particules virales (Alba *et al.*, 2005) (Figure 7).

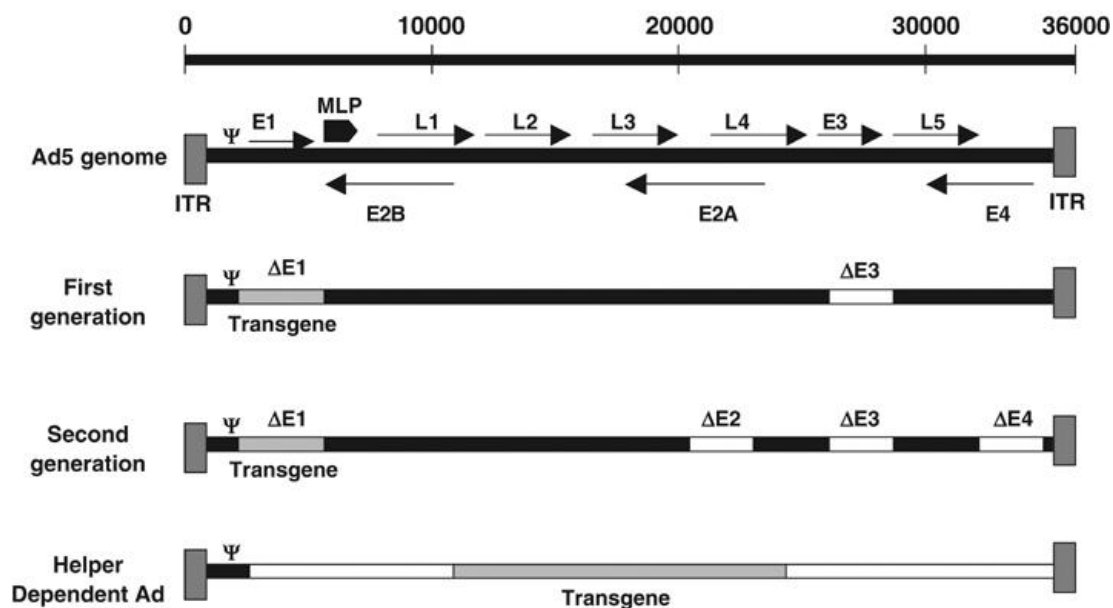


Figure 7 : Différentes générations de vecteurs adaptés du génome de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) (Alba *et al.*, 2005). La taille des séquences est exprimée en pb. La séquence correspondant au

transgène est modélisée en gris dans chaque construction. ITR : *Inverted Terminal Repeat*, séquences nécessaires à la circularisation du génome viral et à sa persistance sous forme d'épisomes ; elles jouent également le rôle de promoteur, notamment pour les séquences précoces. Ψ : signal d'encapsidation du génome ; seules les séquences pourvues de ce signal sont susceptibles d'être présentes au sein de la capside des particules virales matures. MLP : *Major Late Promoter*, promoteur responsable de l'expression des séquences tardives. Δ : délétion de la séquence correspondante.

Les sérotypes d'adénovirus les plus employés en tant que vecteurs de thérapie génique correspondent aux sérotypes 2 et 5, qui sont très bien caractérisés. Ces vecteurs sont particulièrement adaptés à la transduction de cellules eucaryotes, notamment mammaliennes : ils présentent une grande efficacité de transduction, à la fois dans les cellules quiescentes et en division, au sein desquels ils sont non intégratifs ; ce sont des vecteurs à large tropisme, mais il est également envisageable de modifier leurs protéines de capside, afin d'orienter le tropisme viral vers certains tissus ; enfin, ce sont des vecteurs compatibles avec une production à grande échelle, car il est possible d'obtenir des titres pouvant atteindre 10^{13} particules/mL (Alba *et al.*, 2005).

Une première génération de vecteurs non réplcatifs a été développée, constitués de l'ensemble du génome adénoviral à l'exception du MLP et de la région E1. Cette dernière est constituée des séquences E1A et E1B qui favorisent respectivement l'entrée et le maintien du cycle cellulaire, dont la machinerie fournit les facteurs nécessaires à la réplication du virus lui-même. La région E3, qui est corrélée au blocage de la réponse immunitaire antivirale, a également été supprimée dans certaines constructions (Danthinne and Imperiale, 2000 ; Figure 7). Bien que ces vecteurs de première génération ne puissent pas se répliquer *in vivo* (la région E1 étant indispensable à ce processus), il a été montré que l'expression résiduelle des gènes adénoviraux déclenche une réponse immunitaire liée aux lymphocytes T cytotoxiques et dirigée vers les cellules transduites, qui aboutit à l'élimination de ces dernières et ainsi à la perte du transgène thérapeutique (Yang *et al.*, 1994) ; cette réponse est majorée lors de la suppression de la région E3.

Pour contourner ce problème, une seconde génération de vecteurs adénoviraux a été mise au point, combinant la délétion des régions E1, E2, E4 et parfois E3 (Figure 7). La délétion de ces régions a permis d'augmenter à 14kb (au lieu de 8kb en première génération) la taille maximale des séquences à encapsider (Amalfitano *et al.*, 1998 ; Armentano *et al.*, 1997). Cependant, cette seconde génération s'est caractérisée, comme la première, par une immunogénicité non négligeable *in vivo*, en lien avec l'expression résiduelle des séquences virales restantes.

Une troisième et dernière génération de vecteurs *Gutless* ou *Gutted Ad* (vecteur adénoviral « vidé »), dépourvus de l'ensemble des régions adénovirales codantes, a finalement été générée (Figure 7), permettant de réduire la stimulation du système immunitaire et ainsi d'augmenter la stabilité des séquences introduites dans les cellules transduites. Ces vecteurs sont également appelés *Helper Dependant Ad* et *High-capacity adenoviruses*, d'une part car leur production nécessite la présence d'un adénovirus auxiliaire doté de l'ensemble des régions codantes supprimées dans les

vecteurs, et d'autre part car ils sont capables d'encapsider des séquences d'ADN pouvant atteindre 36kb. Les séquences d'origine adénovirale contenues dans ces vecteurs de troisième génération se résument aux séquences ITR 5' et 3', et au signal d'encapsulation Ψ (Alba *et al.*, 2005).

Pour une efficacité d'encapsulation optimale des vecteurs adénoviraux, la taille des séquences génomiques contenues dans les particules virales doit atteindre 75 à 105% du génome adénoviral natif (Alemany *et al.*, 1997 ; Bett *et al.*, 1993). En considérant que les cassettes d'expression de transgène atteignent rarement la taille de 36 kb, il est nécessaire de compléter la séquence encapsidée par ajout d'ADN *stuffer* (« garnisseur » ; séquences indiquées en blanc dans la figure 7). Ces séquences doivent être choisies avec attention, car il a été montré qu'elles jouent un rôle dans la stabilité de la cassette d'expression transgénique au sein des cellules transduites (Schiedner *et al.*, 2002). Le plus souvent, ce sont des régions introniques qui sont employées, telles que celles du gène *HPRT* (*Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase*) (Sandig *et al.*, 2000).

Les vecteurs adénoviraux se sont illustrés dans différents protocoles de thérapie génique. Le premier essai clinique autorisé employant ce type de vecteurs s'est déroulé en 1993 (Crystal *et al.*, 1994) : des vecteurs adénoviraux recombinants pourvus de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène *CFTR* humain ont été introduits dans l'épithélium nasal et bronchique de 4 patients atteints de mucoviscidose. Les résultats de cet essai furent positifs (expression épithéliale de l'ADNc *CFTR*, en l'absence de réponse immunitaire délétère et de dissémination ou recombinaison du vecteur adénoviral), et ouvrirent la voie à des études similaires dans le traitement de la mucoviscidose par thérapie génique (Bellon *et al.*, 1997).

Plus récemment, en Octobre 2003, la société Shenzhen SiBiono GenTech a obtenu de la *State Food and Drug Administration of China* (agence de régulation du médicament chinoise) la première autorisation de commercialisation d'un médicament de thérapie génique au monde. Ce médicament, commercialisé en Chine sous la dénomination de spécialité Gendicine, se compose d'un vecteur adénoviral recombinant exprimant le facteur de transcription p53, impliqué dans d'importantes fonctions cellulaires telles que l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire, et dont le gène est muté ou absent dans une majorité de tumeurs humaines. Gendicine est indiqué dans le traitement du carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou (HNSCC) ; il est administré au sein même de la tumeur, où l'expression de p53 induit un arrêt du cycle cellulaire, l'entrée en apoptose, et une stimulation de la réponse immunitaire cellulaire. Les résultats des essais cliniques conduits par la société Shenzhen SiBiono GenTech ont montré qu'après 8 semaines d'injections hebdomadaires de Gendicine, administré conjointement à un traitement par radiothérapie, 64% des patients atteints de HNSCC à un stade tardif présentaient une régression complète de la tumeur, tandis que 32% présentaient une régression partielle (Pearson *et al.*, 2004 ; Shenzhen SiBiono GeneTech, consulté le 20.08.15). Dernièrement, l'administration intraartérielle conjointe de Gendicine et d'hydroxycamptothécine

(chimiothérapie) a montré un bénéfice clinique significatif dans le prolongement de la survie de patients atteints de carcinome hépatocellulaire avancé, en comparaison avec la chimiothérapie seule (Chen *et al.*, 2014) ; des essais de phase I ont également révélé que des injections intraépithéliales répétées de Gendicine étaient bien tolérées et s'accompagnaient d'une réponse clinique significative chez des patients atteints de leucoplasie orale dysplasique, le précurseur le plus commun du carcinome épidermoïde oral (Zhang *et al.*, 2009).

II- 3.2.1.1.2 Vecteurs viraux associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus (*Adeno-Associated Viruses*, AAV) appartiennent à la famille des *Parvoviridae*. Ce sont des virus à ADN monocaténaire linéaire, non enveloppés, d'un diamètre d'environ 20 nm, et dont la réplication est dépendante de la présence d'un virus auxiliaire, principalement l'adénovirus (d'où leur nom) et l'herpesvirus (Daya and Berns, 2008). Comme les adénovirus, les AAV sont fréquemment rencontrés chez l'Homme (70 à 80% de la population est séropositive), mais ne sont en revanche associés à aucune pathologie connue. 11 sérotypes différents d'AAV ont été identifiés, chacun correspondant à un tropisme cellulaire particulier.

Les vecteurs dérivés des AAV résultent du remplacement des gènes Rep et Cap de l'AAV sauvage, respectivement responsables de la réplication virale et de la synthèse des protéines de capsid, par le transgène thérapeutique (Figure 8). Ces vecteurs sont communément utilisés dans les études de thérapie génique, essentiellement parce que les AAV sauvages ne sont assimilés à aucune pathogénicité chez l'Homme, et que les vecteurs présentent une faible immunogénicité, associée à un maintien possible de l'expression du transgène pendant plusieurs années dans des cellules quiescentes chez lesquelles ils persistent sous forme d'épisome (Hollinger and Chamberlain, 2015). Cependant, le principal inconvénient des vecteurs AAV correspond à leur faible capacité d'empaquetage de la cassette d'expression du transgène, qui est au maximum de 5 kb.

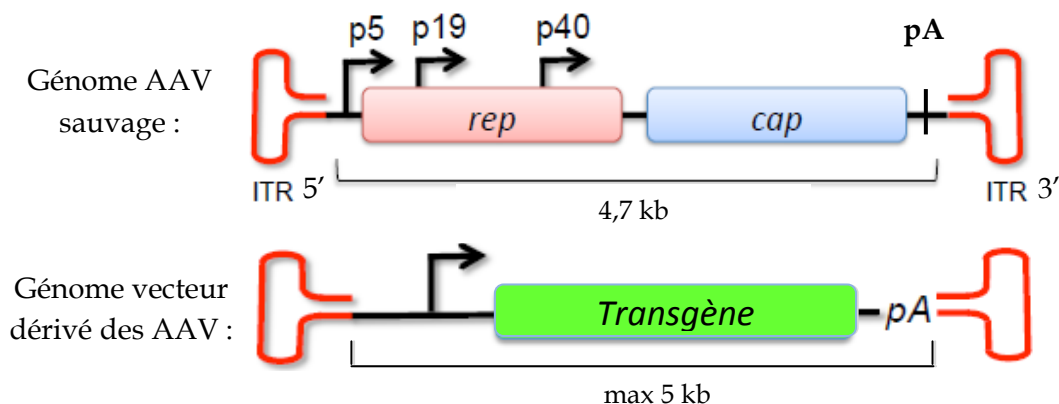


Figure 8 : Comparaison génomique AAV sauvage/vecteur dérivé des AAV (d'après une figure créditée par M. Alexis Bemelmans, MIRCen / CEA). La séquence des AAV sauvages supprimée lors de la construction des vecteurs comprend, en plus des gènes Rep et Cap évoqués précédemment, les

promoteurs responsables de l'expression de ces gènes (p5 et p19 pour Rep, p40 pour Cap), ainsi qu'un signal de polyadénylation (pA) ; des séquences promotrices et de polyadénylation doivent donc être ajoutées au transgène pour assurer son expression. Seules les séquences ITR de l'AAV sauvage sont conservées, car elles sont nécessaires à l'encapsidation du génome dans les particules virales (signal d'encapsidation Psi présent dans l'ITR 5', non représenté sur la figure).

Les vecteurs dérivés des AAV sont à l'origine du premier médicament de thérapie génique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché en Europe, en 2012 : il correspond à l'Alipogene Tiparvovec, dont le nom de spécialité est Glybera®, commercialisé par la société uniQure (Haddley, 2013 ; Morishita, 2015 ; Wierzbicki and Viljoen, 2013). Ce médicament est indiqué dans le traitement du déficit en lipoprotéine lipase (LPLD), maladie rare héréditaire consécutive à des altérations du gène codant pour la lipoprotéine lipase (gène *LPL*) ; cette enzyme étant impliquée dans le métabolisme des graisses, son dysfonctionnement se traduit par une augmentation des taux de chylomicrons (complexes lipido-protéiques) dans le sang pouvant être à l'origine d'épisodes de pancréatite aiguë. Glybera®, administré en intramusculaire, a pour objectif de restaurer l'activité enzymatique de la LPL nécessaire au métabolisme des chylomicrons. Il se compose d'un variant naturel du gène *LPL* codant pour une protéine à haute activité enzymatique, dont l'expression est contrôlée par un promoteur spécifique du tissu musculaire, tissu le plus impliqué physiologiquement dans la production de LPL ; l'ensemble de la construction est introduit dans un vecteur AAV non répliatif de sérotype 1, ayant un tropisme particulier pour les cellules musculaires. Les données cliniques du traitement (cohorte de 27 patients) indiquent une activité biologique intramusculaire persistante de la LPL après une seule injection de Glybera®, s'accompagnant d'une réduction significative du taux sanguin de chylomicrons et d'une diminution de la fréquence des pancréatites aiguës. Le médicament a en outre été très bien toléré chez l'ensemble des patients (*UniQure, consulté le 16.08.15a ; UniQure, consulté le 16.08.15b*).

Les vecteurs dérivés des AAV ont également démontré leur efficacité et leur sécurité dans des protocoles de thérapies géniques ciblant d'autres maladies monogéniques, telles que l'amaurose congénitale de Leber, la choroidémie (rétinopathie pigmentaire liée au chromosome X, caractérisée par des dommages du réseau vasculaire rétinien entraînant une perte de la vision) et l'hémophilie de type B (pathologie hémorragique héréditaire liée au déficit ou à l'absence du facteur de coagulation IX) (Kotterman and Schaffer, 2014).

II- 3.2.1.2 Vecteurs intégratifs

Les vecteurs viraux intégratifs insèrent leur matériel génétique (qui contient le transgène thérapeutique) dans le génome de l'hôte ; ce matériel est donc transmis aux cellules filles en cas de divisions cellulaires. Grâce à ces caractéristiques, les vecteurs intégratifs sont particulièrement adaptés aux approches de thérapie génique nécessitant une expression permanente du transgène. Cependant, l'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte expose l'individu receveur à

d'importants risques de dérégulation d'expression des gènes, principalement caractérisés par une mutagénèse insertionnelle (apparition de mutations génomiques suite à l'insertion de séquences exogènes) et un dysfonctionnement des éléments régulateurs de l'expression des gènes.

Les familles de vecteurs viraux intégratifs majoritairement employées dans les protocoles de thérapie génique correspondent aux vecteurs dérivés des rétrovirus et des lentivirus.

II- 3.2.1.2.1 Vecteurs rétroviraux

Les rétrovirus se rapportent à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*, qui fait elle-même partie de la famille des *Retroviridae* ; ils se répartissent en 5 genres, alpha, bêta, gamma, delta et epsilon rétrovirus, qui ne seront pas distingués ici (NCBI - National Center for Biotechnology Information, consulté le 21.08.15).

Les particules rétrovirales présentent un diamètre d'environ 100 nm et sont munies d'une enveloppe. Leur génome, long de 7 à 12 kb, se compose de deux segments linéaires identiques d'ARN monocaténaire, de polarité positive (polarité identique à celle des ARN messagers cellulaires) et reliés de façon covalente à leur extrémité 5'. Tous les génomes rétroviraux présentent 3 gènes communs, nommés *GAG*, *POL* et *ENV*, qui codent pour des polyprotéines devenant matures après action lytique d'une protéase rétrovirale (Konvalinka *et al.*, 2015). Les protéines résultant de l'expression de *GAG* correspondent à l'ensemble des protéines de structure des particules virales (matrice, nucléocapside) ; le gène *POL* code pour les enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase, et protéase dans la majorité des cas) ; le gène *ENV* est responsable de la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe. Les gènes *GAG*, *POL* et *ENV* sont encadrés en 5' par les segments **R** (qui comporte la séquence promotrice TATA Box et le site d'initiation de la transcription, actifs en 5', ainsi que la séquence signal de polyadénylation, active en 3') et **U5** (nécessaire au processus d'intégration du génome viral au sein du locus cellulaire cible) ; l'extrémité 3' est composée des segments **U3** (qui contient des séquences *enhancer*, activatrices de transcription) et **R** (Dufait *et al.*, 2013 ; Nolan Lab, consulté le 29.08.15) (Figure 9).

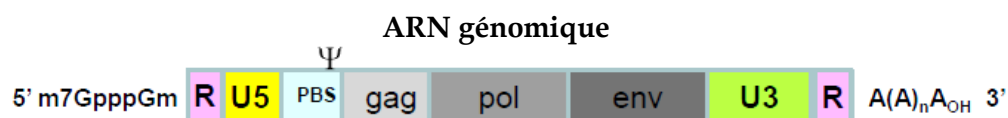


Figure 9 : Représentation générale du génome rétroviral (d'après une figure créditée par M. David Fenard, Généthon / Inserm UMR_S951). Séquence m7GpppGm : coiffe 5', nécessaire à la stabilité de l'ARN et à l'initiation de la traduction en protéine. Séquence A(A)_nA_{OH} : séquence polyA, nécessaire à la stabilité de l'ARN. PBS : *Primer Binding Site*, séquence complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARN de transfert. Ψ : Psi, séquence signal d'encapsidation du génome dans les particules rétrovirales.

La transcriptase inverse et l'intégrase sont des enzymes constitutives des particules rétrovirales ; elles sont nécessaires à la réplication des rétrovirus, qui est elle-

même dépendante de l'intégration du matériel génétique viral au sein du génome de la cellule hôte (Rosadas and Puccioni-Sohler, 2015). Ce processus peut être décomposé en deux étapes principales, consécutives à la pénétration intracellulaire des particules virales par fusion des membranes : dans un premier temps, la transcriptase inverse réalise la « rétrotranscription » (ou transcription inverse) de l'ARN rétroviral en ADN complémentaire dans le cytoplasme de la cellule hôte. Dans un deuxième temps, après franchissement passif de l'enveloppe nucléaire (les rétrovirus se répliquent uniquement dans des cellules en division, dont l'enveloppe nucléaire est fragmentée), l'ADN néosynthétisé s'intègre au sein du génome cellulaire à l'aide de l'intégrase ; il est alors appelé « ADN proviral ». Cette seconde étape nécessite la formation d'une boucle par l'ADN viral complémentaire, dont la résolution aboutit à la duplication du segment U3 en 5' du génome, et du segment U5 en 3' du génome. Les séquences 5'U3-R-U53' ainsi formées de part et d'autre de l'ADN proviral correspondent aux LTR (Long Terminal Repeat), responsables du contrôle de l'expression des gènes rétroviraux (Levy, 2013 ; Wayengera, 2010) (Figure 10).

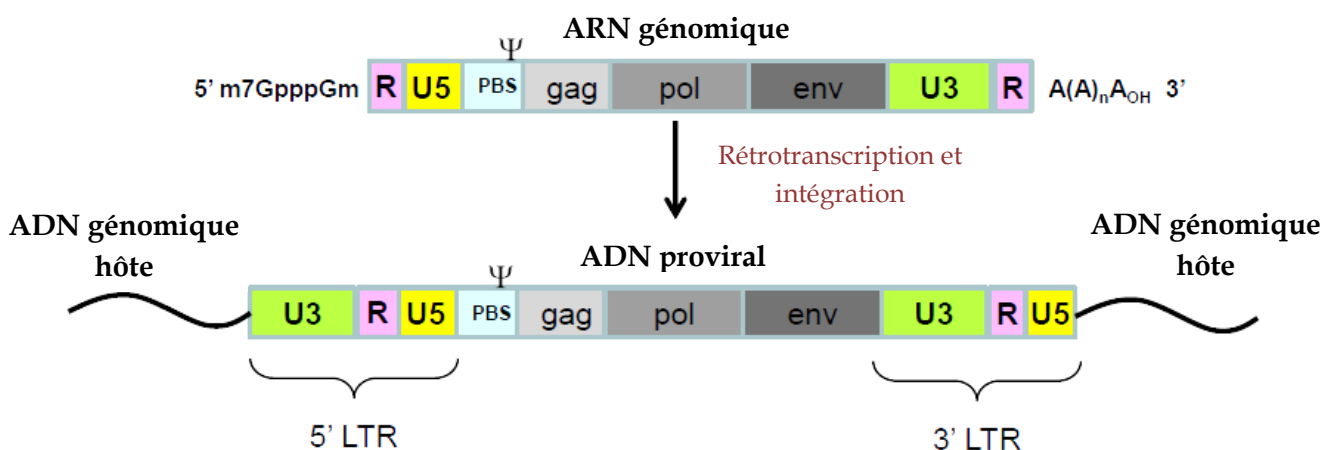


Figure 10 : Modification du génome rétroviral après intégration dans le génome cellulaire (d'après une figure créditée par M. David Fenard, Généthon / Inserm UMR_S951). Les caractères et symboles utilisés présentent la même signification que dans la figure 9.

Les rétrovirus sauvages étant susceptibles d'induire des pathologies graves chez l'Homme (telles que la leucémie à lymphocytes T provoquée par le virus *Human T-Lymphotropic Virus 1*, HTLV-1 ; Verdonck *et al.*, 2007), afin d'éviter tout risque de libération de virus répliatifs chez les patients, il est conseillé de produire les vecteurs rétroviraux à l'aide de 3 plasmides, au minimum : il faut considérer que plus le génome viral natif est morcelé, plus les risques de recombinaison et de réversion vers un phénotype sauvage sont réduits (Figure 11). Chez ces vecteurs, le transgène encapsidé doit présenter une longueur maximale de 8 kb.

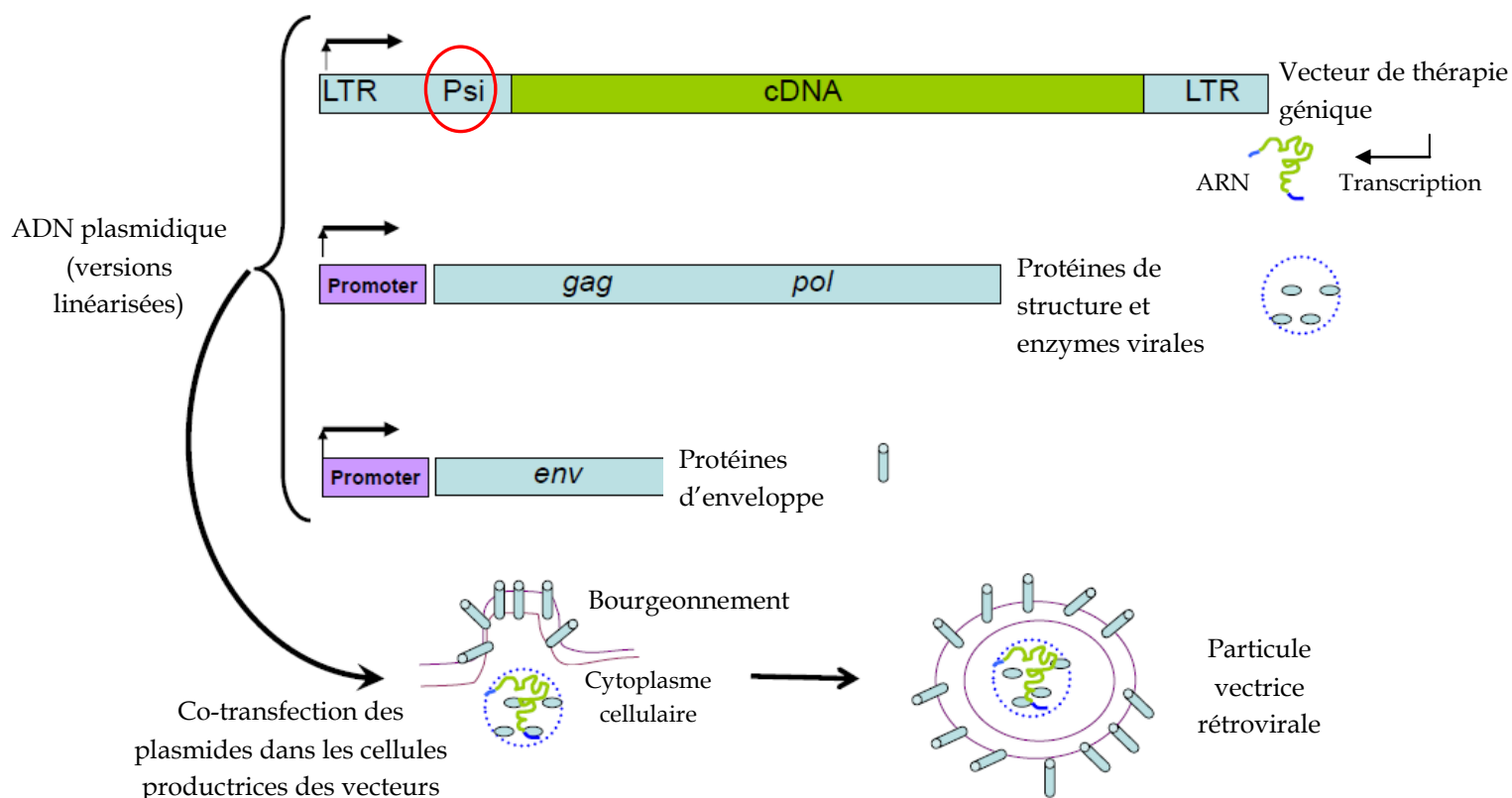


Figure 11 : Production de vecteurs rétroviraux (d'après une figure créditée par M. David Fenard, Généthron / Inserm UMR_S951). cDNA : ADN complémentaire correspondant au transgène d'intérêt ; seule cette séquence s'accompagne du signal d'encapsidation Psi, et sera donc introduite dans les particules virales vectrices après transcription en ARN génomique viral.

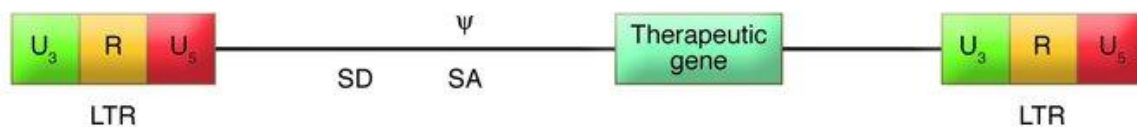
L'importante efficacité de transduction des vecteurs, et la possibilité d'une expression permanente du transgène d'intérêt après insertion dans le génome hôte, ont placé les vecteurs rétroviraux au centre de nombreux projets de recherche en thérapie génique, à la fin du XX^e siècle. Ainsi, le premier essai clinique de thérapie génique autorisé au monde, mis en place en 1990 par WF Anderson et RM Blease, impliquait l'intervention de ces vecteurs : l'essai était destiné à traiter le déficit immunitaire combiné sévère (caractérisé par une absence combinée des fonctions lymphocytaires T et B) consécutif à une insuffisance en adénosine désaminase (ADA) chez l'Homme, par introduction *ex vivo* du gène sauvage codant pour l'ADA dans des lymphocytes T autologues, à l'aide de vecteurs rétroviraux (Blaese *et al.*, 1995 ; Fischer *et al.*, 1999).

Si les résultats cliniques furent difficilement interprétables, du fait du maintien d'un traitement pharmacologique en parallèle de la thérapie génique, le protocole mis en place a quant à lui ouvert la voie à d'autres essais, dont celui réalisé par l'équipe d'Alain Fisher en 1999. Cet essai avait pour objectif le traitement du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X, caractérisé par un blocage du développement des cellules lymphocytaires T et *natural killer* (NK) : il consistait en l'introduction *ex vivo* à l'aide de vecteurs rétroviraux d'une version sauvage du gène causal, le gène codant pour la sous-unité γ_c du récepteur aux interleukines 2, 4, 7, 9 et 15, au sein de précurseurs

médullaires CD34⁺ (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Les résultats cliniques de cet essai se sont révélés très encourageants, se traduisant par une expression du récepteur γc dans les cellules T et NK des patients encore mesurable 10 mois après l'administration des vecteurs de thérapie génique, et par la présence de lymphocytes T, B et de cellules NK caractérisés par un taux et une fonction comparables aux individus sains. Cependant, le déroulement de cet essai s'est distingué par l'apparition de 4 cas de leucémies sur les 11 patients traités par l'équipe de Fischer, liée à un événement de mutagenèse insertionnelle survenu au sein du locus du proto-oncogène *LMO-2* (*LIM domain Only 2*), dans sa région promotrice. L'insertion de la séquence provirale a provoqué un effet enhanceur du LTR viral sur la transcription du gène *LMO-2*, probablement responsable de la transformation cellulaire (il avait auparavant été montré que l'expression aberrante de *LMO-2* est associée à une forme de leucémie aiguë lymphoblastique) (Fischer *et al.*, 2004).

Afin d'éviter la survenue de ces complications, l'utilisation de vecteurs rétroviraux modifiés a été envisagée, de façon à réduire le risque d'effet enhanceur exercé par le LTR rétroviral (Figure 12).

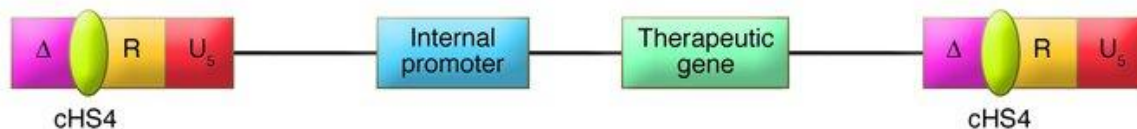
A Retroviral vector used for the SCID clinical trials



B Self-inactivated vectors



C Self-inactivated vector containing 2 x (250 bp) cHS4 insulators



D Self-inactivated vector containing insulator and a suicide gene (TK)

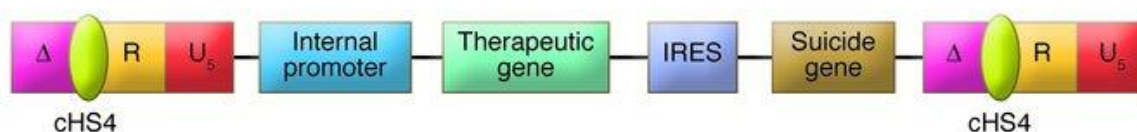


Figure 12 : Représentation schématique de vecteurs rétroviraux et de leurs modifications,

permettant d'améliorer leur sécurité (d'après Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007). (A) La transcription du gène thérapeutique est dirigée par l'activité enhancer-promoteur de la région U3 du LTR rétroviral. (B) La transcription du gène thérapeutique est dirigée par un promoteur interne (ici promoteurs ubiquitaires, PGK : phosphoglycérate kinase et EF-1 α : *elongation factor-1 α*), tandis que la région U3 des LTR rétroviraux est supprimée : vecteurs *Self-Inactivated*, réduction du risque d'effet enhancer des LTR. (C) Le vecteur se compose de deux séquences insultrices CHS4 (*chicken beta-globin 5'-DNase I-Hypersensitive Site 4*), qui isolent l'ADN externe de l'influence du vecteur rétroviral et réciproquement. (D) La transcription de la cassette provirale est dépendante du promoteur interne, et aboutit à la synthèse de deux protéines distinctes grâce à la présence de la séquence IRES (*Internal Ribosome Entry Site*, permettant une initiation de la traduction indépendante de la coiffe 5' de l'ARN messenger) : d'une part, le gène thérapeutique, et d'autre part, un gène suicide. La présence d'un gène suicide est destinée à éliminer les cellules génétiquement corrigées en cas d'apparition d'effets indésirables tels qu'une prolifération cellulaire monoclonale, potentiellement oncogénique. Le gène codant pour la thymidine kinase (TK) du virus *Herpes simplex*, responsable de la mort cellulaire par blocage de la réplication de l'ADN après administration de Ganciclovir, est fréquemment utilisé. SD : splice donor ; SA : splice acceptor ; ψ : séquence signal d'encapsulation.

L'expression tissulaire de la cassette rétrovirale peut également être adaptée. Dans un premier temps, il est possible de « pseudotyper » l'enveloppe des particules vectrices rétrovirales : lors de la construction du plasmide codant pour les protéines d'enveloppe (Figure 11), le gène *ENV* peut être remplacé par d'autres séquences, ce qui entraîne une modification des protéines d'enveloppe exprimées et du tropisme des vecteurs lentiviraux (initialement restreint aux cellules exprimant le récepteur CD4 et ses corécepteurs). Cela permet d'élargir le tropisme cellulaire (expression de protéines à large tropisme telles que les glycoprotéines du virus de la stomatite vésiculaire, VSV-G), ou de le restreindre (exemple du virus de la leucémie murine pseudotypé par les antigènes de surface du virus de l'hépatite B humain, ciblant strictement les hépatocytes primaires humains), et d'augmenter le taux de transduction des cellules cibles (Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007 ; Sung and Lai, 2002).

Dans un deuxième temps, il est envisageable de moduler l'expression de la cassette après intégration dans le génome cellulaire, en choisissant des promoteurs internes à large tropisme (PGK, EF-1 α , Figure 12) ou à sélectivité restreinte, tels que les promoteurs K14, Tie2 et CaMKII s'exprimant respectivement dans les kératinocytes, les cellules endothéliales et les cellules neurales.

Afin d'aller plus loin dans la maîtrise des effets des vecteurs intégratifs au sein du génome cellulaire, les avancées scientifiques les plus récentes ont pour objectif d'améliorer le contrôle de l'intégration de ces vecteurs. En ce qui concerne les vecteurs rétroviraux, la principale approche développée a consisté en la construction de protéines de fusion entre l'intégrase et un domaine de liaison à l'ADN, permettant de guider l'enzyme vers un site génomique précis. Plusieurs combinaisons ont été mises au point, dont la fusion de l'intégrase du virus du sarcome aviaire avec le domaine de liaison à l'ADN du répresseur *lexA* dérivé d'*Escherichia coli* (Katz *et al.*, 1996), cependant les nombreux obstacles rencontrés par ces outils (dégradation des protéines de fusion, difficultés d'encapsulation) n'ont pas encore permis d'envisager une application thérapeutique.

II- 3.2.1.2.2 Vecteurs lentiviraux

Comme les rétrovirus vus antérieurement, les lentivirus appartiennent à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*, membre de la famille des *Retroviridae* ; leurs propriétés structurales et biologiques sont donc similaires (NCBI - National Center for Biotechnology Information, consulté le 21.08.15).

Cependant, trois caractéristiques importantes des lentivirus diffèrent avec celles des rétrovirus, et présentent un intérêt significatif pour l'élaboration des vecteurs lentiviraux. Premièrement, les lentivirus sont capables de franchir activement la membrane nucléaire : contrairement aux rétrovirus, les lentivirus sont donc actifs à la fois dans les cellules quiescentes et en division (Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007 ; Koontz, 2013), ce qui permet d'envisager l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour cibler des cellules à faible taux de prolifération, telles que les neurones et les cellules hépatiques (Naldini *et al.*, 1996 ; Sung and Lai, 2002). De plus, bien que constitué de deux LTR encadrant les 3 gènes fondamentaux *GAG*, *POL* et *ENV*, le génome des lentivirus présente une organisation plus complexe que celle des rétrovirus : il inclut en effet des gènes accessoires et de régulation absents chez les rétrovirus (Dufait *et al.*, 2013) (Figure 13). Enfin, tandis que les rétrovirus tendent à insérer leur matériel génétique au sein des régions promotrices des gènes, il a été montré que l'intégration du génome lentiviral s'effectue préférentiellement en aval des sites d'initiation de transcription génique (Nienhuis *et al.*, 2006). Ces deux dernières propriétés semblent conférer un profil d'intégration génomique plus sûr aux lentivirus, et ainsi aux vecteurs lentiviraux.

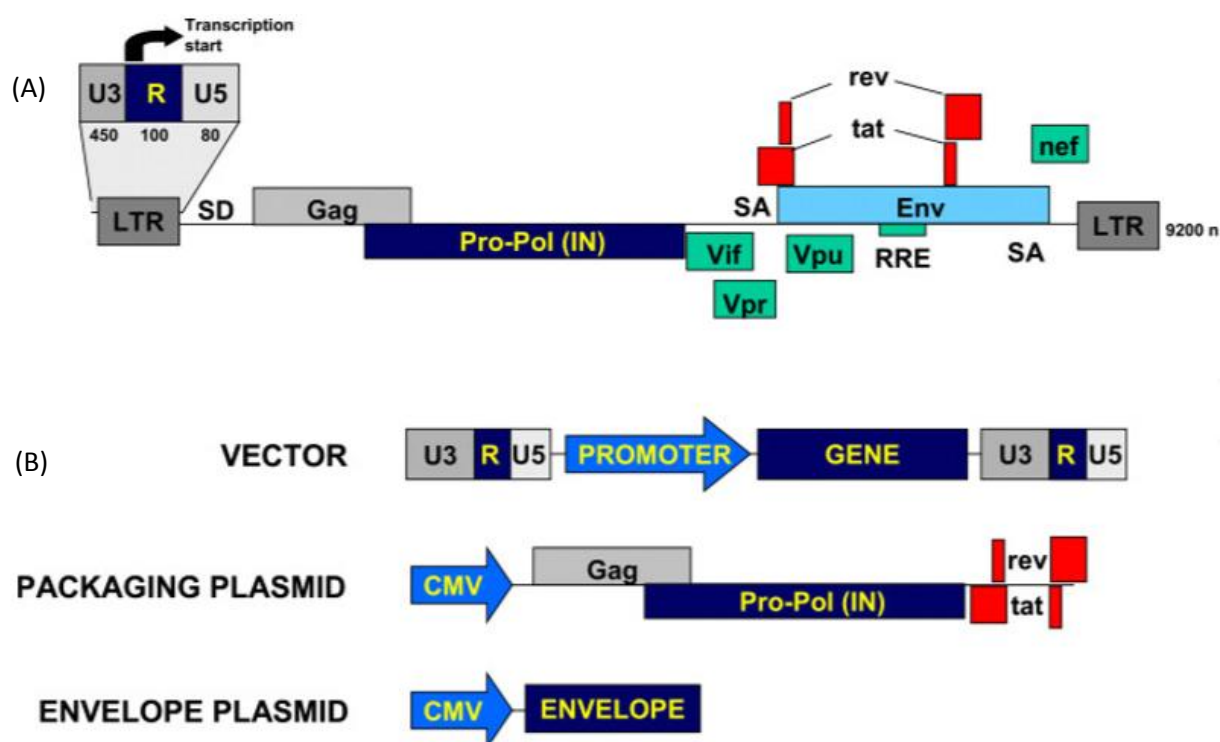


Figure 13 : Représentation schématique du génome et des vecteurs lentiviraux (d'après Dufait *et al.*, 2013). (A) Génome lentiviral après intégration dans celui de la cellule hôte. Taille du génome lentiviral

représenté : 9200 nucléotides. Comme chez les rétrovirus, le gène GAG code pour les protéines de structure virales, le gène *POL* code pour la protéase (Pro), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (non mentionnée), et le gène *ENV* est responsable de la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe. En rouge : séquences codant pour les protéines de régulation du lentivirus ; Rev : protéine essentielle au transport post-transcriptionnel de l'ARN messenger viral incomplètement ou non épissé, depuis le noyau vers le cytoplasme ; Tat : protéine transactivatrice de la transcription de l'ADN proviral et du génome des cellules infectées, et modulatrice de différentes voies de signalisation cellulaires pour conduire à l'expansion de l'infection virale et à une dérégulation immunitaire. En vert : séquences codant pour les protéines accessoires du lentivirus, nécessaires au processus infectieux *in vivo* ; Vpr : favorise la dissémination du lentivirus au sein des lymphocytes T CD4⁺, et interfère avec la réponse antivirale spécifique des macrophages ; Vif, Vpu et Nef : confèrent au virus la capacité d'atténuer les effets délétères d'une réponse immunitaire antivirale induite par les interférons en interagissant avec différents facteurs de l'immunité cellulaire ; RRE : *Rev Responsive Element*, séquence de liaison de la protéine Rev. SD : splice donor ; SA : splice acceptor. (Chiozzini and Toschi, 2015 ; Collins *et al.*, 2015 ; Lesnik *et al.*, 2002 ; Mlcochova *et al.*, 2015 ; Seelamgari *et al.*, 2004). (B) Le génome lentiviral est scindé en 3 plasmides différents pour la construction des vecteurs lentiviraux. Le plasmide « vecteur » est muni d'un promoteur interne qui contrôle l'expression du transgène d'intérêt, tandis que les séquences promotrices et activatrices de transcription situées dans la région U3 des LTR sont inactives. Afin d'optimiser la sécurité du protocole de transduction, les séquences accessoires favorisant le processus infectieux ne sont pas conservées au sein du plasmide de « conditionnement » (*packaging*) des particules lentivirales. La séquence « *envelope* » contenue dans le troisième plasmide peut correspondre au gène *ENV*, ou être remplacée par une séquence exogène pour « pseudotyper » les particules lentivirales et moduler leur tropisme cellulaire. L'expression des deux derniers plasmides est ici sous la dépendance d'un promoteur fort, celui du cytomégalo virus (CMV).

Comme nous venons de l'évoquer, les propriétés naturelles des lentivirus assurent une maîtrise de l'intégration génomique des vecteurs lentiviraux plus importante que celle des vecteurs rétroviraux ; cependant, la gravité des pathologies engendrées par certains lentivirus (telles que le syndrome de l'immunodéficience acquise, consécutif à une infection par les virus *Human Immunodeficiency Virus 1 et 2* ; Huraux, 2003) impose la prudence lors du développement de protocoles de thérapie génique impliquant l'emploi de vecteurs lentiviraux.

Des techniques similaires à celles employées pour modifier les vecteurs rétroviraux ont été envisagées pour contrôler les effets génomiques des vecteurs lentiviraux. Des vecteurs lentiviraux présentant des délétions au niveau de la région U3 des LTR (*Self-Inactivated*) ont ainsi été développés, et ont démontré leur sécurité *in vitro* au cours de protocoles de thérapies géniques ciblant différentes maladies monogéniques, telles que le syndrome de Wiskott-Aldrich (Coci *et al.*, 2015) et la drépanocytose (hémoglobinopathie héréditaire caractérisée par une déformation des globules rouges et une réduction de leur capacité de transport de l'oxygène, consécutive à une anomalie du gène codant pour une sous-unité de l'hémoglobine, la bêta-globine) (Urbinati *et al.*, 2015). Les vecteurs employés dans cette dernière étude étaient également pourvus de séquences insultrices, décrites chez les vecteurs rétroviraux.

L'expression tissulaire des transgènes véhiculés par les vecteurs lentiviraux peut également être modulée, en employant des promoteurs internes similaires à ceux décrits pour les vecteurs rétroviraux, et/ou en pratiquant un « pseudotypage »

des protéines d'enveloppe des particules vectrices lentivirales. Le pseudotypage est notamment utilisé dans le développement de protocoles de thérapie génique pour le traitement de la mucoviscidose, au sein desquels les vecteurs lentiviraux mis au point expriment des protéines dérivées de Filovirus, qui permettent une transduction efficace de l'épithélium respiratoire *in vitro* et *in vivo* (Kobinger *et al.*, 2001). Afin d'obtenir une spécificité optimale de ciblage, il est également envisageable d'induire l'expression d'anticorps déterminés au niveau de l'enveloppe des particules virales, comme cela a été fait par l'équipe de Yang : cette dernière est parvenue à transduire spécifiquement des lymphocyte B humains *in vitro* et *in vivo* (chez la souris) par des vecteurs lentiviraux exprimant des anticorps anti-CD20 (Yang *et al.*, 2006).

Enfin, comme pour les vecteurs rétroviraux, la maîtrise du site d'intégration du génome proviral constitue une étape supplémentaire pour parvenir à un contrôle total des effets des produits de thérapie génique après administration chez l'Homme.

Deux approches ont pour le moment été explorées : la première est similaire à la stratégie étudiée chez les vecteurs rétroviraux, qui correspond à l'élaboration de protéines de fusion entre l'intégrase (ou l'un de ses facteurs d'interaction) et un domaine de liaison à l'ADN pour guider l'action de l'enzyme vers un site génomique spécifique. L'équipe de Ciuffi a ainsi obtenu *in vitro* l'intégration stricte de génomes proviraux dérivés du virus de l'immunodéficience humaine aux abords des sites de liaison LambdaR situés dans l'ADN du phage lambda, grâce à l'expression d'une protéine de fusion entre LEDGF/p75 (élément du complexe de préintégration, interagissant avec l'intégrase) et le domaine de liaison à l'ADN de la protéine répresseur du phage lambda (LambdaR) (Ciuffi *et al.*, 2006).

La seconde stratégie développée consiste en l'association d'un vecteur lentiviral défectif pour l'intégrase (IDLV, *Integrase-Defective Lentiviral Vector*) et d'un outil biomoléculaire d'ingénierie génétique, en l'occurrence une nucléase à doigts de zinc (ZFN, *Zinc Finger Nuclease*, nucléase clivant spécifiquement les séquences désoxyribonucléotidiques reconnues par les protéines à doigts de zinc qui lui sont associées ; voir sous-partie « Outils et approches de correction génique »). 40% d'une population de fibroblastes de patients atteints d'anémie de Fanconi (pathologie génétique à transmission hétérogame caractérisée par des malformations congénitales variables, une insuffisance médullaire d'apparition retardée et un risque élevé d'apparition de leucémie aiguë et de cancers) ont ainsi été corrigés génétiquement après introduction de la version sauvage du gène *FANCA* (principal gène muté chez les patients) par recombinaison homologue, au sein du locus cellulaire *AAVS1* (*AAV integration Site 1*, cible de l'intégration des AAV sauvages, et reconnu comme sécuritaire par la communauté scientifique). Le protocole impliquait la co-transduction de vecteurs IDLV pourvus du gène *FANCA* flanqué de séquences d'homologie avec *AAVS1*, et de vecteurs adénoviraux exprimant des ZFN spécifiques du locus *AAVS1* ; après correction, les fibroblastes furent reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites avant d'être différenciés en progéniteurs hématopoïétiques dont le phénotype s'est révélé non pathologique (Rio *et al.*, 2014).

II- 3.2.2 Vecteurs non viraux

Malgré les récentes améliorations mises en œuvre dans le développement des vecteurs viraux, deux limitations majeures aux applications cliniques subsistent : la sécurité des vecteurs (liée aux effets génomiques, aux risques de réversion et de recombinaison avec des virus sauvages, et aux réactions immunitaires potentiellement déclenchées par les vecteurs), et leur capacité de vectorisation quant à la taille des transgènes véhiculés.

C'est dans ce contexte qu'une importance nouvelle a été accordée aux vecteurs non viraux qui, en plus de dépasser les contraintes précédemment évoquées, présentent une organisation plus simple et une manipulation plus flexible (Jones *et al.*, 2015).

Cependant, ces vecteurs n'étant dotés d'aucun pouvoir infectieux, leur introduction au sein des cibles cellulaires de thérapie génique est plus complexe que celle des vecteurs viraux, et nécessite pour la plupart l'assistance de techniques facilitant le passage transmembranaire, telles que celles évoquées plus haut.

Les paragraphes suivants présentent les principaux vecteurs non viraux utilisés actuellement dans les protocoles de thérapie génique, ainsi que des exemples d'applications.

II- 3.2.2.1 Vecteurs plasmidiques et artificiels

Les applications les plus conventionnelles de thérapie génique par vectorisation non virale sont basées sur la délivrance des séquences d'intérêt par le biais de structures désoxyribonucléotidiques circulaires ou linéarisées, temporairement actives dans les cellules cibles et dérivées de microorganismes.

Les outils les plus fréquents sont présentés dans les paragraphes suivants.

II- 3.2.2.1.1 Vecteurs plasmidiques

Les plasmides correspondent à des fragments d'ADN circulaires extrachromosomiques, dérivés de bactéries au sein desquelles ils s'expriment et se répliquent indépendamment de l'ADN chromosomique.

Ces molécules, d'une taille généralement comprise entre 3 et 10 kb, sont d'abord introduites au sein de bactéries afin d'être amplifiées par clonage, puis elles sont purifiées avant d'être insérées dans les cellules où le transgène doit s'exprimer. Leur composition reflète ces deux étapes (Figure 14) : pour le clonage bactérien, 1) une origine de répllication, séquence permettant l'initiation de la répllication du plasmide dans les bactéries par recrutement des facteurs bactériens associés, 2) un gène de résistance à un antibiotique, nécessaire à la sélection des bactéries pourvues du plasmide, et 3) un site multiple de clonage, qui correspond à un court fragment d'ADN contenant plusieurs sites de restriction enzymatique et permettant l'insertion du transgène (sur la figure 14, seuls deux sites de restriction, encadrant le transgène

introduit dans le plasmide, sont représentés) ; pour l'expression cellulaire, 1) un marqueur de sélection des cellules dotées du plasmide et 2) une région promotrice, située en amont du site multiple de clonage et responsable de la spécificité et du taux de transcription cellulaire du transgène (Monroe, consulté le 04.09.15). La capacité de vectorisation des plasmides s'étend généralement de 8 à 10 kb.

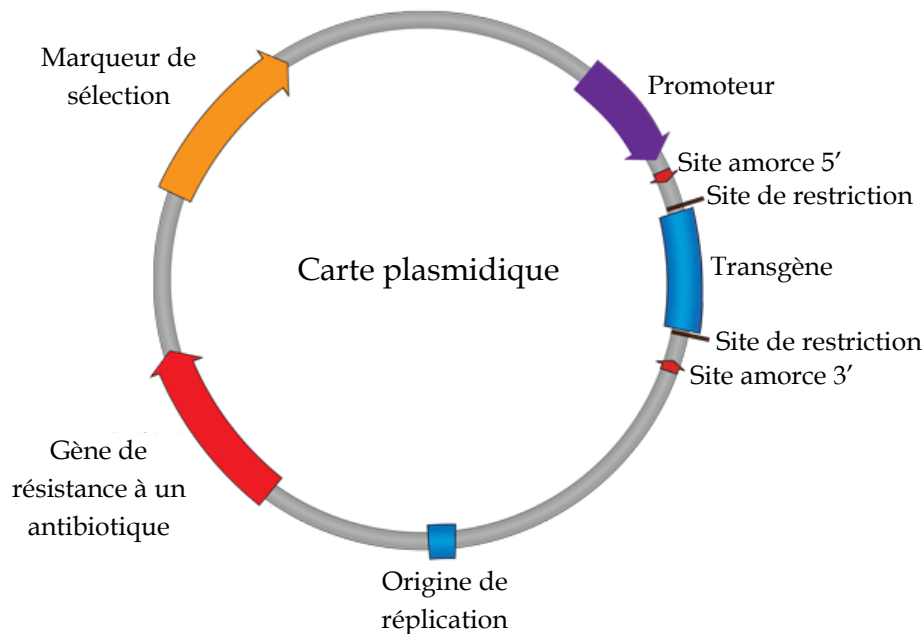


Figure 14 : Représentation schématique d'un plasmide pourvu d'un transgène (d'après Monroe, consulté le 04.09.15). En plus des principaux éléments cités plus haut, deux sites de liaison d'amorces sont représentés sur la carte du plasmide. Les amorces, qui correspondent à de courtes séquences d'ADN simple-brin d'environ 20 nucléotides, sont dans ce cas principalement utilisées lors de réactions de séquençage, dans l'objectif de vérifier la présence du transgène au sein du plasmide.

La flexibilité et la simplicité de construction des plasmides, principalement basée sur l'utilisation d'enzymes de restriction, les placent en outils de choix pour la délivrance de transgènes thérapeutiques au sein de cellules spécifiques : c'est ce type de construction qui a été utilisée dans l'étude du traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1 par recombinaison homologe ciblée (voir partie « Etudes expérimentales »).

II- 3.2.2.1.2 Chromosomes artificiels

Les chromosomes artificiels (ou minichromosomes) correspondent à des structures dérivées de chromosomes cellulaires naturels, capables de se répliquer et de ségréger indépendamment des chromosomes dont ils sont issus. Ces structures sont composées des éléments essentiels au maintien et à la transmission des chromosomes naturels : 1) une origine de réplication, à partir de laquelle s'effectue la duplication de l'ADN chromosomique ; 2) une région centromérique, qui assure une migration et une ségrégation correctes du minichromosome ; 3) des séquences

télomériques, qui protègent les extrémités des chromosomes linéaires (Henning *et al.*, 1999).

Ces vecteurs peuvent être dérivés de phages (P1), de bactéries (*Escherichia coli*) ou de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ; ils sont alors nommés respectivement PAC (Phage Artificial Chromosome), BAC (Bacterial AC) et YAC (Yeast AC) (Henning *et al.*, 1999) (Figure 15, exemple d'un YAC).

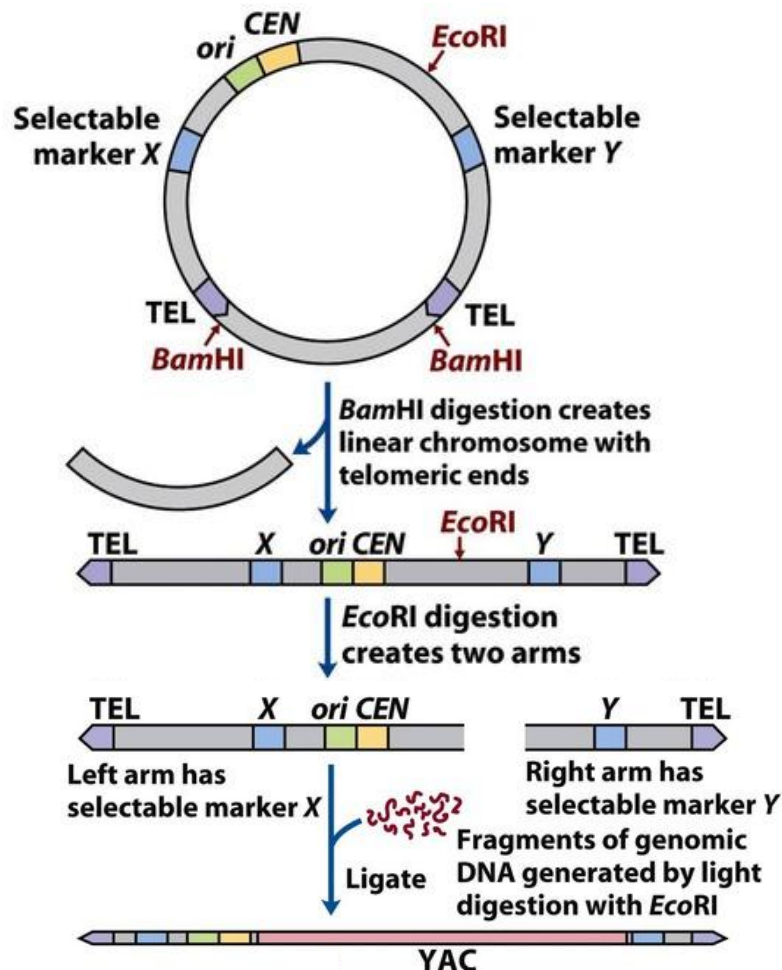


Figure 15 : Protocole général de développement d'un YAC (d'après Nelson and Cox, 2008). L'hydrolyse du chromosome de levure par BamHI aboutit à l'obtention d'un fragment d'ADN chromosomique linéarisé et borné par des séquences télomériques (TEL). Une seconde étape d'hydrolyse (ici, par EcoRI) permet de scinder le fragment linéarisé en deux bras distincts, pourvus chacun d'un marqueur de sélection X ou Y (permettant d'assurer une sélection de la structure intégrée au terme du développement), qui sont finalement ligués avec un fragment d'ADN exogène (génomique ou complémentaire) préalablement hydrolysé à l'aide d'enzymes compatibles. Une fois la ligation terminée, les YAC sont introduits dans des cellules hôtes de levures afin de se multiplier, avant d'être purifiés et soumis à des réactions ultérieures. Ori : origine de réplication dans la levure ; CEN : centromère.

Si les chromosomes artificiels présentent une tendance à favoriser la recombinaison de leur insert (particulièrement importante chez les YACs), ce sont en revanche des molécules mitotiquement stables au sein de leurs cellules hôtes, et elles

sont en outre capables de véhiculer de grandes quantités d'ADN transgénique (45 à 100 kb pour les PAC, jusqu'à 300 kb pour les BAC, 100 à 2000 kb pour les YAC) (Prescott *et al.*, 2003).

Ces vecteurs ont été très utilisés pour le séquençage de génomes (Prescott *et al.*, 2003) et, bien que leur emploi en thérapie génique soit modeste, l'efficacité de leur vectorisation par des bactéries invasives chez les cellules mammaliennes (telles que *Escherichia coli*) a conduit à un regain d'intérêt envers ces outils pour la délivrance de gènes (Laner *et al.*, 2005 ; Pérez-Luz *et al.*, 2007).

En parallèle, la mise au point de chromosomes artificiels humain (HAC), a définitivement relancé l'attrait des minichromosomes. Les HAC ne semblent pas présenter de taille limite concernant leur insert, ils sont ainsi capables de véhiculer des loci génomiques entiers, comprenant un ou plusieurs gènes pourvus de l'ensemble de leurs éléments régulateurs. De plus, et contrairement à l'ensemble des autres vecteurs épisomaux, les HAC sont mitotiquement stables au sein des cellules humaines, et permettent ainsi le maintien de l'expression du transgène associé au cours des divisions cellulaires (stabilité vérifiée après 30 jours de culture de lignées cellulaires humaines pourvues de HAC, Rudd *et al.*, 2003). Enfin, si la mauvaise connaissance de la structure des HACs et des difficultés d'insertion du transgène ont longtemps freiné leur application en thérapie génique, la résolution récente de ces limitations a permis l'introduction et l'expression de nombreux gènes humains (β -globine, facteur IX, CFTR) dans différents types cellulaires, *in vitro* et *in vivo* (Kazuki and Oshimura, 2011 ; Kouprina *et al.*, 2013).

II- 3.2.2.2 Vecteurs chimiques

Ces vecteurs utilisent la propriété de complexation des acides nucléiques avec différents agents susceptibles d'interagir avec les membranes physiologiques afin de faciliter leur franchissement, en masquant les charges négatives des séquences nucléotidiques (Richard, 2003). Les vecteurs chimiques les plus courants correspondent aux lipides cationiques, aux polymères et aux polysaccharides.

Le mécanisme de transfert des séquences nucléotidiques dans les cellules est unique, pour tous les vecteurs chimiques : après interaction avec la membrane plasmique, les vecteurs sont endocytés, et se retrouvent prisonniers du système endosomal, au sein du cytoplasme. La libération du cargo d'acides nucléiques s'effectue après lyse des endosomes, qui est liée à l'effet tampon résiduel du vecteur : les fonctions aminées électriquement neutres présentes (en minorité) sur les vecteurs synthétiques attirent une importante quantité d'ions H^+ , qui sont suivis par des ions Cl^- ; l'arrivée de molécules d'eau destinées à rétablir l'équilibre osmotique entraîne alors une lyse endosomale et la libération du transgène.

L'ensemble de ces vecteurs présente une importante capacité de vectorisation en termes de taille des séquences véhiculées, la majorité étant le plus souvent employée en association à des fragments d'ADN intégrés au sein de plasmides.

II- 3.2.2.2.1 Vecteurs lipidiques

La méthode de vectorisation chimique la plus anciennement utilisée en thérapie génique correspond au transfert de gènes *via* les lipides, ou « lipofection » (Felgner *et al.*, 1987). Ces lipides cationiques sont caractérisés par une structure amphiphile à 3 domaines : une tête hydrophile cationique qui interagit avec les fonctions phosphates chargées négativement des acides nucléiques, une queue hydrophobe qui s'associe avec les lipides des membranes cellulaires et un *linker* (fonction carbonée) reliant ces deux domaines (Li *et al.*, 2015). La figure 16 indique la structure de quelques lipides cationiques utilisés en tant que vecteurs d'acides nucléiques.

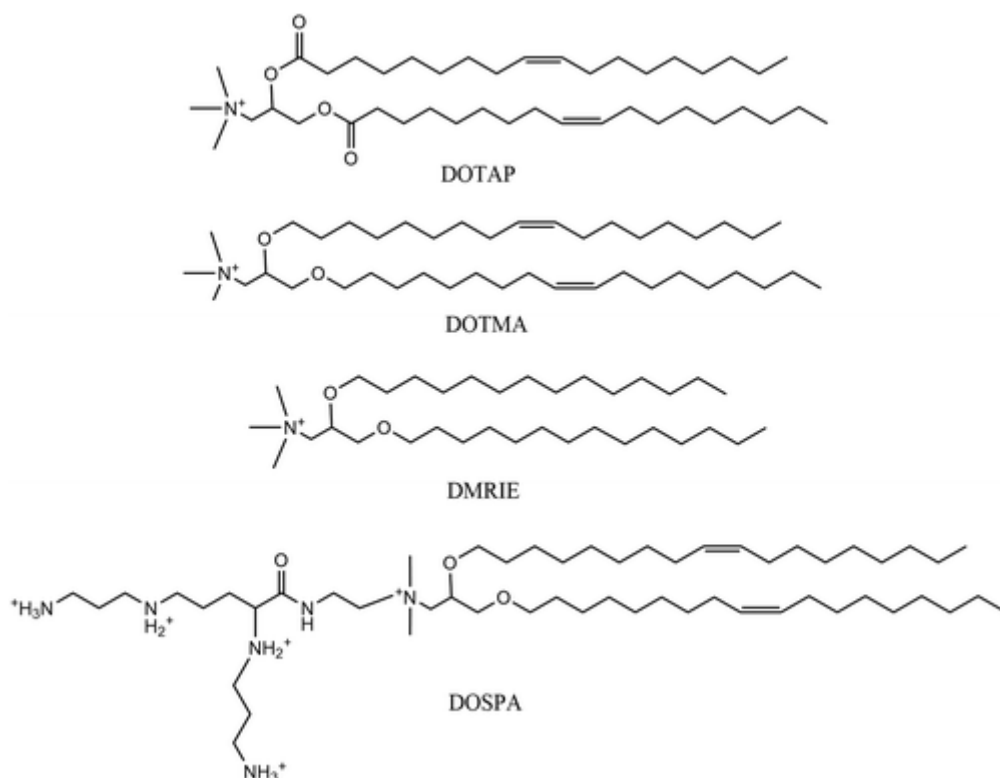


Figure 16 : Structure chimique des lipides cationiques communément utilisés en thérapie génique (Li *et al.*, 2015). Les structures sont représentées en environnement acide, chargées positivement ; les têtes hydrophiles cationiques sont constituées de fonctions ammoniums quaternaires. DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammoniumpropane ; DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride ; DMRIE : 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyethyl ammonium bromide ; DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarioxamido)ethyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacetate. Le DOSPA est notamment disponible chez Thermo Fisher Scientific en mélange avec le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine ou DOPE, sous le nom de marque Lipofectamine®.

Les vecteurs dérivés de lipides cationiques les plus fréquents correspondent aux liposomes, qui consistent en de petites vésicules artificielles formées par l'association de phospholipides amphiphiles et de cholestérol : ces composés s'auto-

assemblent en une ou plusieurs couches renfermant un cœur aqueux (Figure 17), au sein duquel les séquences nucléotidiques d'intérêt se situent (Li *et al.*, 2015).

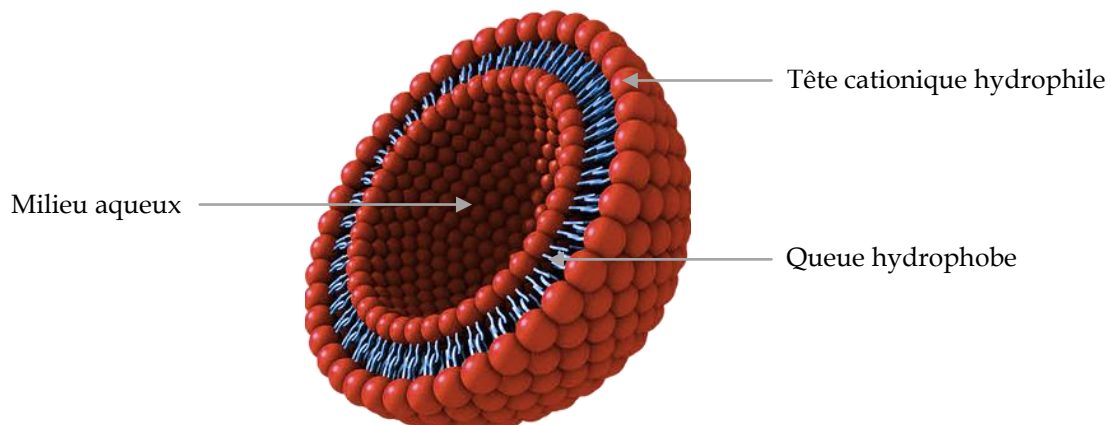


Figure 17 : Représentation schématique d'un liposome (d'après Palma Biotech, consulté le 07.09.15). La figure représente un liposome unilamellaire.

Les vecteurs liposomaux peuvent véhiculer des molécules d'ARN et d'ADN, que ces dernières soient déjà vectorisées (au sein de plasmides, cas les plus fréquents) ou non. Ils sont considérés comme très attractifs du fait de leur faible immunogénicité, de leur biodégradabilité satisfaisante, et de la disponibilité de solutions commerciales dédiées à la formation des vésicules. En outre, les vastes possibilités d'ingénierie et de combinaison des liposomes avec des molécules de polyéthylène glycol, d'anticorps ou la technologie des ultrasons, qui optimisent la pérennité de ces outils au sein de l'organisme et le ciblage des cellules destinées à être corrigées, favorisent leur utilisation *in vivo*. A titre d'exemple, les systèmes liposomaux de délivrance d'acides nucléiques ont été employés dans des protocoles d'essais cliniques de thérapie génique ciblant le cancer et la mucoviscidose (Alton *et al.*, 2013 ; Omata *et al.*, 2015 ; Schultheis *et al.*, 2014).

Malgré leur succès, les liposomes présentent des inconvénients qui résident en une importante cytotoxicité, une faible efficacité de transfection cellulaire et des difficultés de production à grande échelle (faible stabilité des particules) pouvant être rédhibitoires pour certains protocoles d'essais cliniques, ce qui incite à l'emploi d'autres types de vecteurs chimiques.

II- 3.2.2.2.2 Vecteurs polymériques

Les vecteurs polymériques sont constitués d'une répétition de groupements aminés complexés de façon électrostatique avec les séquences d'acides nucléiques qu'ils transportent (Figure 18). Ils présentent un intérêt significatif en thérapie génique car ils sont globalement caractérisés par une grande efficacité de transfection, une faible immunogénicité et une production simple à grande échelle (Li *et al.*, 2015). De plus, ces vecteurs peuvent être conjugués à différents ligands, tels

que des anticorps ou des peptides, dans l'objectif de favoriser un ciblage cellulaire spécifique (Chiu *et al.*, 2004). Comme pour les liposomes, différentes solutions commerciales de polymères sont disponibles, dont l'une des plus communes correspond au jetPEI® (Polyplus Transfection).

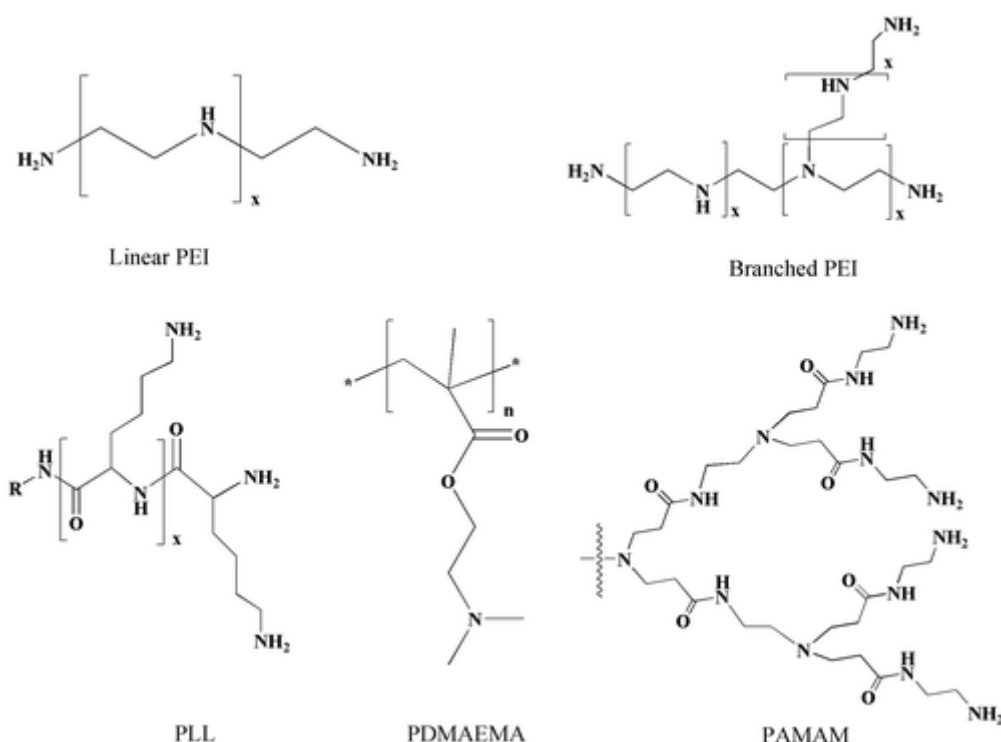


Figure 18 : Structure chimique des principaux vecteurs polymériques (Li et al., 2015). PEI : polyéthylèneimine ; PLL : poly(L-lysine) ; PDMAEMA : poly[2-(diméthylamino) éthyl méthacrylate] ; PAMAM : polyamidoamine.

Les propriétés précédemment énoncées sont à nuancer en fonction des molécules, qui présentent des propriétés hétérogènes : si la polyéthylèneimine présente une excellente efficacité de transfection, elle est cependant très cytotoxique, et non biodégradable pour ses dérivés de plus hautes masses moléculaires ; au contraire, la poly(L-lysine) présente de très bonnes biodégradabilité et biocompatibilité, mais une faible efficacité de transfection à cause d'un effet tampon résiduel insuffisant. Ces caractéristiques sont prises en considération dans le choix des vecteurs associés aux acides nucléiques lors de l'élaboration des protocoles de thérapie génique ; cependant, leur ingénierie est également envisageable pour moduler certaines propriétés, comme cela a été réalisé par l'équipe de Alvarez, qui a associé la polyéthylèneimine au polyéthylène glycol et au cholestérol dans un essai clinique de traitement de cancers gynécologiques, afin d'optimiser le *ratio* efficacité/toxicité des vecteurs (Alvarez *et al.*, 2014).

II- 3.2.2.2.3 Vecteurs polysaccharidiques (Chitosan)

Parmi les vecteurs chimiques, le chitosan est le seul composé dérivé d'éléments naturels : il correspond à un polysaccharide consistant en une association de glucosamine et de N-acétylglucosamine, et il peut être dérivé d'une désacétylation partielle de la chitine, constituant de la carapace des crustacés (Li *et al.*, 2015) (Figure 19).

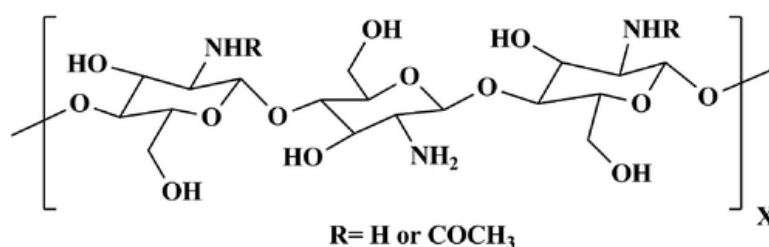


Figure 19 : Structure chimique du chitosan (Li *et al.*, 2015).

Ses origines naturelles confèrent au chitosan les propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité les plus importantes, parmi les vecteurs chimiques ; cependant, l'absence d'effet tampon résiduel de ce vecteur réduit considérablement son efficacité de transfection, et ainsi sa capacité de délivrance des acides nucléiques avec lesquels il est complexé de façon électrostatique. Des associations entre le chitosan et d'autres types de vecteurs, tels que la PEI ou la PLL, ont été développées, présentant le double avantage d'augmenter l'efficacité de transfection du chitosan et de réduire la cytotoxicité des vecteurs polymériques (Li *et al.*, 2015 ; Lu *et al.*, 2008).

Enfin, comme les autres vecteurs chimiques, le chitosan peut être conjugué à des ligands pour moduler sa spécificité cellulaire, tels que des fonctions galactosyl conférant aux vecteurs une efficacité de transfection supérieure pour les cellules HepG2 (lignée cellulaire dérivée d'hépatocarcinome humain), *via* une association aux récepteurs des asialoglycoprotéines (Kim *et al.*, 2004).

II- 3.2.2.3 Intégration génomique des vecteurs non viraux

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'un des principaux avantages des vecteurs non viraux consiste en une meilleure sécurité de leur utilisation, principalement fondée sur une faible immunogénicité et sur leur absence de capacité d'intégration dans le génome des cellules hôtes, qui prévient tout risque de mutagenèse insertionnelle.

Néanmoins, bien que délétère si non contrôlée, l'intégration génomique des séquences transgéniques permet d'obtenir d'une part, une expression pérenne de ces séquences, non seulement maintenue pendant toute la durée de la vie de la cellule corrigée mais également transmise à ces cellules filles, et d'autre part, une régulation

physiologique de cette expression si l'intégration s'effectue au locus du gène déficient.

Les vecteurs non viraux n'étant pas dotés d'intégrases spécifiques telles que les enzymes associées aux vecteurs rétroviraux et lentiviraux, la seule solution permettant d'intégrer le transgène qu'ils véhiculent au génome d'une cellule hôte correspond au recours au processus de recombinaison homologue, au cours duquel les séquences d'un fragment d'ADN exogène viennent remplacer les séquences endogènes avec lesquelles elles présentent une homologie (Lemarchandel and Montagutelli, 1990).

Cependant, la fréquence naturelle de ciblage génique par recombinaison homologue est de 1.10^{-5} à 1.10^{-8} (Doetschman *et al.*, 1987), ce qui est trop faible pour être compatible avec une application thérapeutique. Cet obstacle peut être surmonté par la création d'une coupure double-brin de l'ADN au sein de la région cible de recombinaison, capable d'augmenter plusieurs milliers de fois la fréquence du ciblage, afin d'atteindre des niveaux potentiellement utilisables en thérapeutique (Donoho *et al.*, 1998 ; Porteus and Baltimore, 2003). En effet, la présence de la cassure double-brin active les mécanismes naturels de réparation des dommages cellulaires, correspondant de façon prépondérante à une jonction non homologue des extrémités clivées (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining* ; Figure S1, en annexe), et de manière moins fréquente à la voie de la recombinaison homologue, nommée HDR (*Homology-Directed Recombination* ; Figure S2, en annexe). La réparation consécutive au NHEJ peut conduire à la déstabilisation et à l'interruption du gène cible en introduisant des insertions ou des délétions (« indels »), tandis que la voie HDR peut être utilisée afin d'introduire des modifications précises de la cible, en présence d'une séquence d'ADN matrice (Pu *et al.*, 2015) (Figure 20).

Le transfert de cette découverte vers le domaine de la thérapie génique a nécessité le développement de méthodes permettant de générer des cassures spécifiques de sites, au sein de l'ADN : l'ensemble de ces méthodes est regroupé sous le terme d'édition du génome, ou de modification génique ciblée.

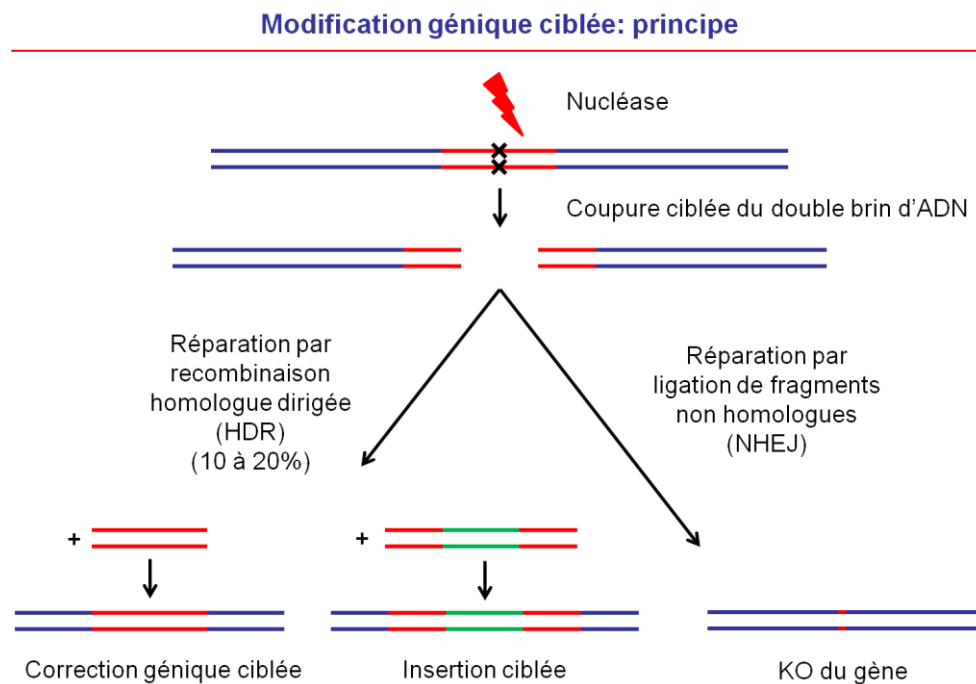


Figure 20 : Voies de réparation des cassures double-brins de l'ADN : emplois en modification génique ciblée. KO : *knock out*, extinction. La correction génique ciblée représente la modification ponctuelle d'une séquence endogène, tandis que l'insertion ciblée consiste en l'introduction d'une séquence exogène au sein du génome. La réparation par NHEJ peut entraîner, *via* la création d'insertions ou de délétions, un décalage du cadre de lecture de la séquence cible, responsable de l'extinction de l'expression du gène correspondant.

Depuis leur mise au point dans les années 1990, et jusqu'en 2010, les méganucléases (MNs) et les nucléases à doigts de zinc (« *Zinc Finger Nucleases* », ZFNs) ont dominé la sphère de la manipulation génétique ciblée. Les MNs, qui fonctionnent en unités monomériques, sont basées sur la structure protéique des endonucléases LAGLIDADG (famille d'endonucléases à domaines en hélices α), qui se lient et clivent de longues séquences cibles d'ADN formées de 14 à 40 nucléotides (Chevalier *et al.*, 2002). Les ZFNs correspondent quant à elles à des protéines dimériques, dont chaque monomère consiste en la fusion du domaine catalytique de l'endonucléase de restriction FokI, et de 3 à 6 domaines protéiques en doigt de zinc se liant à l'ADN (Connelly *et al.*, 2010). Ces deux catégories d'outils d'édition génomique ont permis de modifier le génome d'une grande variété de modèles d'organismes, s'étendant des simples procaryotes aux eucaryotes complexes végétaux et animaux ; les MNs et les ZFNs ont également été employées avec succès à l'introduction de modifications géniques au sein de cellules humaines primaires, telles que les lymphocytes T et les cellules souches hématopoïétiques. De plus, ces technologies ont permis au domaine de l'édition génomique d'entrer dans l'ère des essais cliniques : le premier essai clinique de thérapie génique impliquant des nucléases spécifiques a été mis au point à l'aide de ZFNs, dans l'objectif de créer un système immunitaire résistant à l'infection par le virus de l'immunodéficience

humaine, *via* une altération de la séquence génique codant pour le co-récepteur CCR5 du virus. L'étude a fourni des résultats encourageants, en démontrant que l'injection de lymphocytes T CD4⁺ autologues modifiés par les ZFNs était sûre, et qu'elle rendait l'ARN génomique lentiviral indétectable chez 3 patients parmi les 12 évalués (Tebas *et al.*, 2014). Cependant, la modulation de la spécificité des MNs et des ZFNs est laborieuse, car elle nécessite une ingénierie protéique complexe basée sur une modélisation *in silico* et/ou sur une sélection *in vitro* (Mussolino *et al.*, 2015).

Ces contraintes ont été progressivement dépassées par l'émergence successive de deux nouvelles technologies d'édition génomique, au début des années 2000. En 2010, le déchiffrement du code régissant la spécificité de liaison des facteurs protéiques TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) des bactéries du genre *Xanthomonas* avec leurs sites spécifiques de liaison, dans le génome des plantes qu'elles infectent, a permis la mise au point d'un nouvel outil protéique d'édition génomique, les TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), qui présentent à la fois une haute efficacité de clivage et une importante facilité de développement (Mussolino *et al.*, 2015). Moins de deux ans après la première publication mentionnant l'utilisation des TALENs dans des cellules humaines (Cermak *et al.*, 2011), une nouvelle stratégie de modification génique ciblée, basée sur les découvertes de l'équipe de Charpentier et Doudna à propos de l'immunité bactérienne, a également montré son efficacité dans l'édition du génome humain : la technologie des CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated system*) (Cong *et al.*, 2013). Cet outil, dont le principe réside en un clivage nucléasique d'une séquence cible d'ADN, reconnue par des séquences d'ARN associées à la nucléase, présente une flexibilité et une simplicité d'élaboration inégalées dans le domaine de la manipulation génique ciblée.

Pour le développement du projet de thérapie génique ciblée de l'hyperoxalurie primitive de type 1, nous avons choisi d'utiliser les systèmes TALENs et CRISPR/Cas ; une description plus détaillée de ces outils est ainsi proposée dans les paragraphes suivants.

II- 3.2.2.3.1 Présentation des TALENs

Les membres de la vaste famille des TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) correspondent à des facteurs de virulence de *Xanthomonas* sp., un pathogène de plantes qui modifie l'expression génique de ses cellules hôtes en mimant les facteurs de transcription eucaryotes.

Les effecteurs protéiques TAL isolés chez ces pathogènes sont caractérisés par un domaine central composé de répétitions en tandem, de signaux de localisation nucléaire (NLSs), et d'un domaine acide d'activation de la transcription (AD) (Figure 21). Les membres de cette famille d'effecteurs sont très conservés, ne différant que par la séquence en acides aminés et le nombre de leurs répétitions

centrales. Ce nombre, ainsi que l'ordre des répétitions d'un TALE déterminent son activité spécifique ; par exemple, le membre typique de cette famille, l'effecteur AvrBs3 (Avirulence protein AvrBs3 de *Xanthomonas euvesicatoria*, ciblant les poivriers) contient 17,5 répétitions, qui sont essentielles à la liaison avec ses séquences cibles et représentent un type distinct de domaine de liaison à l'ADN.

Les séquences répétées en tandem consistent chacune en 34 acides aminés, et se distinguent par les unités situées en positions 12 et 13 (en anglais *Repeat Variable Di-residue* ou RVD) (Boch *et al.*, 2009).

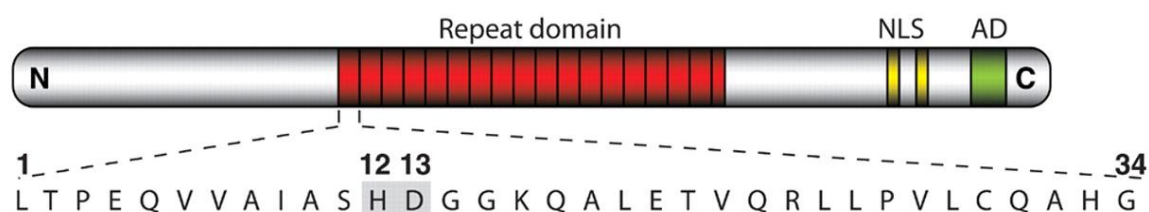


Figure 21 : Modèle représentatif de la structure des effecteurs TAL (Boch *et al.*, 2009). Exemple de l'effecteur AvrBs3 : répétitions en tandem (rectangles rouges), séquences de localisation nucléaire (jaune), et domaine d'activation (vert) ; la séquence d'acides aminés représentée correspond à la première répétition du domaine central. Les acides aminés hypervariables (RVD) situés en positions 12 et 13 sont surlignés en gris.

Les acides aminés qui composent le RVD établissent la spécificité de reconnaissance des bases nucléotidiques de l'ADN, selon les combinaisons suivantes : HD = C ; IG = T ; NG = T ; NI = A ; NN = A ou G ; NS = A, C, G, ou T (où D = acide aspartique ; G = glycine ; H = histidine ; I = isoleucine ; N = asparagine ; S = sérine pour les acides aminés, et A = adénine ; C = cytosine, G = guanine ; T = thymine pour les bases nucléotidiques). Ainsi, l'agencement et la composition des RVD au sein des répétitions centrales en tandem permettent aux TALEs de reconnaître spécifiquement une séquence désoxyribonucléotidique cible (Boch *et al.*, 2009).

Afin de permettre leur utilisation en tant qu'outils de manipulation génique ciblée, ces protéines naturelles ont été fusionnées par ingénierie au domaine catalytique de l'endonucléase de restriction FokI, aboutissant à la formation des protéines TALENs (Mussolino *et al.*, 2011). L'activité nucléasique de FokI requiert l'association de deux domaines catalytiques, devant se lier chacun à un site nucléotidique adjacent. L'emploi des TALENs nécessite donc la construction de dimères, reconnaissant les séquences d'ADN situées en 5' et en 3' du site de coupure souhaité (Kim and Kim, 2014 ; Pu *et al.*, 2015) (Figure 22).

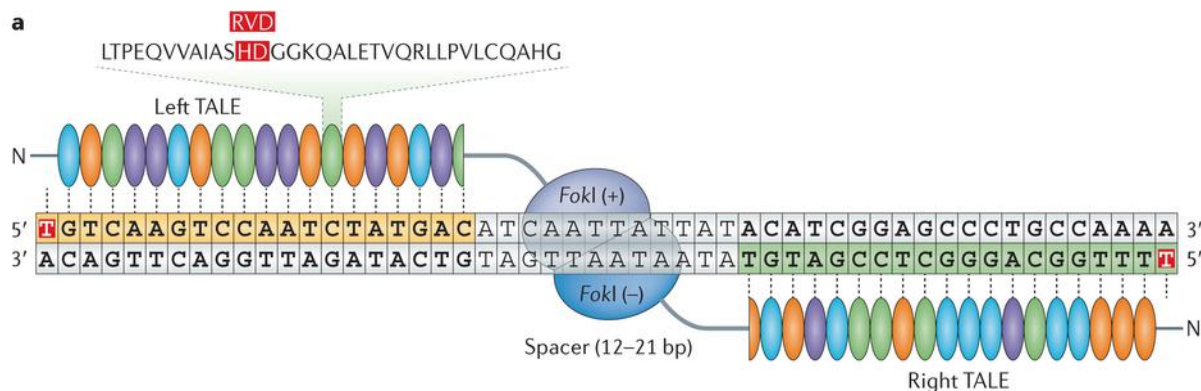


Figure 22 : Ciblage d'une séquence d'acides nucléiques par les TALENs (Kim and Kim, 2014). Les protéines TALEs se lient à leurs séquences cibles (fonds orange et vert) et génèrent une cassure double-brin de l'ADN au niveau d'un site spécifique, après dimérisation des domaines catalytiques de FokI (bleu pastel (+) et bleu vif (-)). Afin d'éviter tout encombrement lors de la dimérisation de ces domaines, les séquences cibles reconnues par les protéines TALEs doivent être séparées par 12 à 21 pb. Les séquences cibles des TALENs sont typiquement précédées d'une thymine (T) à leur extrémité 5'. Le RVD de l'une des répétitions du TALE gauche est surligné en rouge.

Depuis leur découverte, les TALENs ont été utilisées pour cibler *in vitro* des loci génomiques au sein de plusieurs lignées cellulaires humaines, dont les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites (Hockemeyer *et al.*, 2011 ; Jia *et al.*, 2015). Elles ont également été employées *in vivo*, pour modifier le génome de divers mammifères tels que les souris, les rats et les lapins (Qiu *et al.*, 2013 ; Song *et al.*, 2013 ; Tesson *et al.*, 2011). Les applications de cette technologie sont diverses : addition ou délétion de séquences, extinction de l'expression d'un gène, correction *in situ* de mutations génomiques (voir sous-partie « Outils et approches de correction génique »).

Les TALENs constituent donc un outil efficace pour manipuler le génome de façon spécifique et transmissible, aussi bien à des fins thérapeutiques que pour la mise au point de modèles d'étude de pathologies.

II- 3.2.2.3.2 Présentation des systèmes CRISPR/Cas

Les CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) correspondent à des segments de séquence d'ADN répétée découverts dans le génome bactérien. Ils permettent à ces organismes de se protéger contre l'invasion d'acides nucléiques étrangers, comme ceux de virus ou phages (Fineran and Charpentier, 2012 ; Horvath and Barrangou, 2010).

En effet, les bactéries présentant un ou plusieurs loci CRISPR répondent à une invasion virale ou plasmidique par l'intégration de petits fragments d'ADN étranger (« *protospacers* ») entre les séquences répétées des CRISPR. Lors d'une seconde introduction de ces mêmes acides nucléiques étrangers au sein de la bactérie, la

transcription de la matrice composée des fragments d'ADN exogènes insérés entre les séquences répétées endogènes conduit à la formation de précurseurs de CRISPR RNA (« pré-crRNA »). Après clivage enzymatique, ces précurseurs deviennent des crRNAs composés d'un fragment « *spacer* » capable de s'hybrider avec les séquences virales ou plasmidiques à l'origine de la production des crRNAs correspondants (Jinek *et al.*, 2012 ; Pu *et al.*, 2015). La reconnaissance des séquences exogènes par les spacers entraîne leur clivage par une nucléase de la famille des protéines « Cas » (« *CRISPR-associated protein* », famille hétérogène de protéines qui fonctionnent en complexe avec les crRNAs) et ainsi l'extinction de leur expression (Haft *et al.*, 2005).

Il existe trois types de systèmes CRISPR/Cas. Les types I et III partagent plusieurs caractéristiques : les pré-crRNAs sont transformés en crRNAs par des endonucléases Cas spécialisées et, une fois matures, les copies de crRNAs identiques s'assemblent en un large complexe comprenant de multiples protéines Cas, capable de reconnaître et de cliver les séquences d'acides nucléiques complémentaires aux crRNAs. La transformation des pré-crRNAs dans les systèmes de type II s'effectue selon un mécanisme différent, faisant intervenir des ARNs transactivateurs (*transactivating CRISPR RNAs* ou « *tracrRNAs* ») complémentaires des séquences répétées présentes dans les pré-crRNAs. L'hybridation des tracrRNAs avec les pré-crRNAs déclenche la maturation de ces derniers par action de la RNase III (ribonucléase spécifique de l'ARN double-brin), en présence de la Cas9. Il a également été montré que le tracrRNA est nécessaire à la liaison de l'ensemble du complexe CRISPR/Cas9 avec l'ADN cible, et à la stimulation de l'activité nucléasique de la Cas9 (Jinek *et al.*, 2012).

Dans le système de type II de *Streptococcus pyogenes* (le plus étudié), la spécificité du ciblage de la séquence d'ADN exogène repose notamment sur la reconnaissance du « *protospacer adjacent motif* » (PAM) par le complexe Cas9/crRNA. Ce motif, qui correspond à la séquence consensus 5'NGG3' (avec N = A, C, G ou T), constitue un déterminant critique de la liaison initiale du complexe CRISPR/Cas9 à l'ADN cible, et autorise la séparation ultérieure des brins de la double hélice d'ADN, ainsi que l'hybridation crRNA-ADN cible (Anders *et al.*, 2014 ; Fu *et al.*, 2014 ; Ran *et al.*, 2013a) (Figure 23). Le clivage double-brin de l'ADN réalisé par la Cas9 s'effectue majoritairement à une position située 3 bases en 5' du PAM, et entraîne la formation d'extrémités franches : le domaine nucléasique HNH, formé des résidus catalytiques conservés His-Asn-His et d'un site de liaison au zinc (CxxC)₂ (Xu *et al.*, 2013), clive le brin complémentaire au crRNA, tandis que le domaine RuvC-like (RuvC : rôle principal de résolution des jonctions de Holliday (Shah *et al.*, 1997)) clive le brin non complémentaire (Jinek *et al.*, 2012).

Comme les TALENs, le système CRISPR/Cas9 est applicable au clivage spécifique du génome cellulaire d'organismes procaryotes et eucaryotes, à la fois *in vitro* chez divers types cellulaires dont les cellules humaines (lymphocytes T CD4⁺ et cellules souches hématopoïétiques, par exemple), et *in vivo* chez la souris, le hamster, le cochon ou même le singe (Fan et al., 2014 ; Mandal et al., 2014 ; Niu et al., 2014 ; Wang et al., 2013 ; Zhou et al., 2015).

Outre les applications « classiques » de la manipulation génique ciblée évoquées dans la présentation les TALENs, la flexibilité des systèmes CRISPR/Cas permet d'envisager d'autres modes de régulation du génome, combinant les capacités de ciblage spécifique de ces systèmes avec les propriétés effectrices de facteurs régulateurs de l'épigénome et du transcriptome. Pour cela, des protéines Cas9 catalytiquement inactives (Cas9 désactivées ou « dCas9 ») sont placées en fusion avec les facteurs de régulation : la dCas9 joue alors uniquement le rôle d'intermédiaire entre les ARN guides qui orientent la protéine de fusion vers un site génomique spécifique, et les facteurs de régulation qui agissent sur l'expression génomique. Une fusion de la dCas9 a ainsi été établie avec des facteurs activateurs (tels que les protéines transactivatrices VP16 et VP64 dérivées du virus *Herpes simplex*) ou inhibiteurs de transcription (tels que le domaine KRAB, *Krüppel-Associated Box*), qui interagissent avec le complexe de préinitiation de la transcription, mais également avec des facteurs modificateurs de l'épigénome impactant sur l'organisation de la chromatine (l'acétyltransférase par exemple, responsable d'une acétylation des lysines des histones, ce qui provoque la décondensation de la chromatine et l'activation de la transcription) (Gilbert et al., 2013 ; Hilton et al., 2015 ; Mussolino et al., 2015).

Enfin, grâce à leur simplicité d'action et de mise au point, les systèmes CRISPR/Cas9 offrent la possibilité majeure de réaliser un ciblage génique multiple, la Cas9 pouvant être facilement dirigée vers plusieurs cibles en parallèle après co-délivrance de diverses molécules d'ARN guides (Mussolino et al., 2015 ; Ott de Bruin et al., 2015). Cette approche peut être envisagée pour développer des modèles d'étude et des pistes thérapeutiques pour des pathologies multigéniques, en réduisant considérablement le temps nécessaire à l'introduction de modifications génétiques programmées.

Le système CRISPR/Cas9 représente ainsi une technologie prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies de thérapie génique, et pour l'amélioration de la compréhension des pathologies d'origine génétique.

III- Outils et approches de correction génique

Deux types d'approches de thérapie génique ont été développées afin de répondre aux caractéristiques des différentes pathologies ciblées : d'une part, les stratégies focalisées sur la modification des séquences génomiques, et d'autre part, les méthodes visant à moduler l'expression du génome sans modification des séquences.

III- 1. Approches de modification des séquences génomiques

III- 1.1 Thérapie génique additive

Cette approche consiste à introduire une copie fonctionnelle d'un gène (ou son ADN complémentaire, le plus souvent) dans le génome d'une cellule. Selon le transgène introduit, deux applications sont possibles : d'une part, si le transgène correspond à la version sauvage d'un gène déficitaire, on parle de thérapie de remplacement, dont l'objectif est de restaurer la fonction physiologique du gène muté au sein des cellules où cette fonction s'exerce ; d'autre part, si le transgène correspond à une séquence qui n'est pas exprimée physiologiquement dans les cibles cellulaires de la thérapie génique, l'objectif est de renforcer les capacités de défense de l'organisme contre une pathologie considérée en le dotant d'une nouvelle fonction.

La thérapie de remplacement est particulièrement adaptée au traitement des pathologies monogéniques de transmission récessive car, dans ce cas, la modification d'un seul allèle, au niveau du locus du gène déficient, permet de restaurer le phénotype physiologique ; cette stratégie a notamment été utilisée en essais cliniques pour le traitement de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich (gène *WAS* ; Boztug *et al.*, 2010) et de l'anémie de Fanconi (gène *FANCA* ; Rio *et al.*, 2014). Elle présente également l'avantage d'être utilisable chez tous les patients affectés par la pathologie considérée, quelle que soit la mutation à l'origine du dysfonctionnement du gène causal.

Quant aux stratégies conférant une nouvelle fonction aux cellules traitées, elles sont très utilisées dans la lutte contre le cancer, notamment pour favoriser la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire. A titre d'exemple, l'équipe de Porter a démontré récemment qu'une administration de lymphocytes T autologues, transduits à l'aide d'un vecteur lentiviral afin d'exprimer un récepteur chimérique reconnaissant l'antigène CD19 spécifique des lymphocytes B, était efficace chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (caractérisée par une prolifération anormale des lymphocytes B) réfractaire ou à multiples rechutes (Porter *et al.*, 2015).

La méthode du gain de fonction est également envisagée pour soulager les patients atteints de pathologies neurodégénératives, telles que la maladie de

Parkinson. Cette pathologie se caractérise par un dysfonctionnement moteur (tremblements de repos, rigidité et bradykinésie ou ralentissement psychomoteur), consécutif à la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire du cerveau, qui projettent leurs axones vers le striatum où la dopamine est libérée. S'il est complexe de ralentir la progression de la perte neuronale, l'équipe de Palfi a en revanche cliniquement montré qu'il était possible de réduire les symptômes moteurs en faisant produire la dopamine directement par les cellules de la région motrice du striatum (putamen), par injection bilatérale du ProSavin®, un vecteur lentiviral équin codant pour les trois enzymes de la biosynthèse de la dopamine à partir de la tyrosine (tyrosine hydroxylase, décarboxylase des acides aminés aromatiques, cyclohydrolase 1) (Palfi *et al.*, 2014).

En outre, quelle que soit la stratégie adoptée, l'intégration génomique du transgène confère un caractère pérenne à son expression, permettant d'éviter les réadministrations multiples du produit de thérapie génique, et ainsi de réduire les risques de réactions immunitaires dirigées contre lui. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, des précautions sont à prendre pour éviter tout effet délétère lié à l'intégration génomique de la séquence exogène. Deux possibilités sont ainsi envisageables pour une insertion sécurisée : d'une part, une intégration du transgène au sein d'un locus identifié comme sécuritaire, tel que le locus *AAVS1* évoqué précédemment (Rio *et al.*, 2014), et d'autre part, une insertion au sein du locus du gène morbide, ce qui permet une expression du transgène dans l'environnement physiologique du gène causal. C'est cette seconde stratégie qui a été choisie lors du développement du protocole de thérapie génique additive pour l'hyperoxalurie primitive de type 1 (voir partie « Etudes expérimentales »).

Il faut également noter que, si les stratégies de remplacement et d'apport d'une nouvelle fonction sont ici développées selon un mode intégratif, la thérapie génique additive peut également consister en l'expression épisomale de séquences d'ARN ou d'ADN, en particulier lorsqu'une expression génique transitoire est suffisante pour atteindre l'objectif thérapeutique. Cette méthode a notamment été employée par l'équipe de Suresh, qui a induit l'expression transitoire de la thioredoxin-1 (protéine antioxydante, régulatrice de la croissance et de la transcription) dans des cellules souches mésenchymateuses, administrées à des myocardiocytes de rats infarctés à l'aide de vecteurs adénoviraux en vue d'une revascularisation (Suresh *et al.*, 2015).

III- 1.2 Correction génique *in situ* de mutations ponctuelles

Alternativement à l'introduction d'une séquence transgénique dans le génome d'une cellule, les nouvelles technologies d'édition génomique permettent de réaliser une correction spécifique des mutations morbides au sein même des séquences alléliques affectées : cette méthode est nommée correction génique *in situ*. Dans ce

cas, un clivage génomique est effectué par des endonucléases à proximité de la mutation ciblée, et la correction est effectuée par recombinaison homologue avec une matrice comprenant la séquence de remplacement de la cible mutée, flanquée par deux bras d'homologie complémentaires des séquences environnantes (Ott de Bruin *et al.*, 2015).

Il est important de considérer que, contrairement à une stratégie de thérapie génique additive par recombinaison homologue, dont la longueur conséquente des transgènes à introduire (plusieurs milliers de nucléotides) nécessite la mise au point de matrices double-brins à longs bras d'homologie, la méthode de correction génique *in situ* implique quant à elle la recombinaison homologue de séquences très courtes, de quelques centaines de nucléotides : la mise en présence d'une matrice simple-brin à courts bras d'homologie (quelques dizaines de nucléotides) est alors suffisante au phénomène de recombinaison (Wang *et al.*, 2008 ; voir partie « Etudes expérimentales »).

De plus, le fait de corriger uniquement la mutation autorise la conservation des séquences promotrices, activatrices de transcription et de tous les autres éléments régulateurs endogènes, ce qui permet de préserver l'expression physiologique du gène.

A titre d'exemples, la méthode de correction génique *in situ* a été employée avec succès dans le développement de pistes thérapeutiques pour l'épidermolyse bulleuse (pathologie de la jonction dermo-épidermique caractérisée par un décollement de l'épiderme, suite à un dysfonctionnement du gène *COL7A1* codant pour le collagène VII) (Osborn *et al.*, 2013), la β -thalassémie (hémoglobinopathie caractérisée par un déficit en chaînes β de l'hémoglobine, une érythropoïèse inefficace et une hémolyse, en lien avec une altération du gène codant pour la β -globine) (Ma *et al.*, 2013) et la drépanocytose (Sebastiano *et al.*, 2011). Les deux premières approches ont été réalisées à l'aide de TALENs, et la troisième avec des ZFNs ; dans le projet de correction génique ciblée de l'hyperoxalurie primitive de type 1, nous souhaitons également développer une approche de correction génique *in situ*, en employant toutefois le système CRISPR/Cas9, plus simple à manipuler. Cette stratégie sera mise en œuvre parallèlement à une approche de thérapie génique additive impliquant les TALENs (voir partie « Etudes expérimentales »).

III- 1.3 Interruption de la séquence d'un gène par introduction de mutations : méthode du *knocking out*

Lorsque l'expression d'un gène participe au développement d'une pathologie, il peut être nécessaire de la supprimer au sein des tissus cibles de cette pathologie.

La méthode la plus efficace actuellement disponible pour éteindre l'expression d'un gène correspond à l'introduction ciblée de mutations au sein de sa séquence, à l'aide d'endonucléases spécifiques. En effet, nous avons vu précédemment qu'après clivage double-brin d'une séquence d'ADN par les MNs, ZFNs, TALENs et CRISPR/Cas, deux mécanismes de réparation sont activés : le processus de

recombinaison homologue HDR et la voie de jonction non homologue des extrémités NHEJ, qui est prépondérante. Tandis que le mécanisme de HDR répare la cassure en préservant la séquence génomique originale, le NHEJ se traduit dans la majorité des cas par la création d'insertions ou de délétions au sein de la séquence réparée, responsables d'un décalage du cadre de lecture et d'un arrêt de la synthèse protéique. La création d'« indels » étant irréversible, une administration unique des endonucléases (en l'absence de matrice de recombinaison, qui favoriserait le mécanisme HDR), vectorisées de façon non intégrative (sous forme d'ADN ou d'ARN messager), suffit à l'obtention d'effets pérennes.

La méthode de *knocking out* est particulièrement adaptée au traitement des pathologies infectieuses : la stratégie réside en une inactivation de l'expression d'un gène indispensable à la pénétration et/ou à la dissémination des agents infectieux au sein de leurs cibles cellulaires. Cette approche a fourni des résultats encourageants chez les souris puis chez l'Homme dans le traitement des infections par le virus de l'immunodéficience humaine, *via* l'administration de lymphocytes T autologues résistants à l'infection virale suite à une extinction de l'expression du corécepteur CCR5 du virus, comme nous l'avons évoqué précédemment (Perez *et al.*, 2008 ; Tebas *et al.*, 2014).

En amont du développement de thérapies par modification génique, l'extinction de l'expression des gènes est également utile à l'établissement de modèles d'études des pathologies d'origine génétique, qu'elles soient monogéniques (génération d'un modèle de déficit immunitaire combiné sévère chez le rat, Mashimo *et al.*, 2010) ou multigéniques, la flexibilité du système CRISPR/Cas offrant la possibilité d'une extinction simultanée de plusieurs gènes (Li *et al.*, 2013 ; Ott de Bruin *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2013).

III- 2 Approches de modulation de l'expression génomique

III- 2.1 Réduction (ou *knocking down*) de l'expression génique par interférence à ARN

Le concept d'interférence à ARN (*RNA interference* ou « RNAi ») a été établi en 1998 à partir d'études réalisées chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998) : il réside en une inhibition spécifique de l'expression génique, suite à la reconnaissance de séquences d'ARN messagers (ARNm) endogènes par des fragments d'ARN double-brins. En 2001, l'équipe du Dr Tuschl a découvert le principe actif de ce mécanisme, consistant en des duplexes d'ARN d'une longueur de 21 à 22 nucléotides, désignés alors en tant que *small interfering RNAs* ou « siRNAs » (Elbashir *et al.*, 2001a ; Elbashir *et al.*, 2001b).

Au sein des cellules animales, les siRNAs dérivent de la maturation de séquences d'ARN plus longues et présentant des structures en épingles à cheveux, appelées *microRNAs* ou « miRNAs ». Le processus de synthèse et de maturation des miRNAs est décrit dans la figure 25.

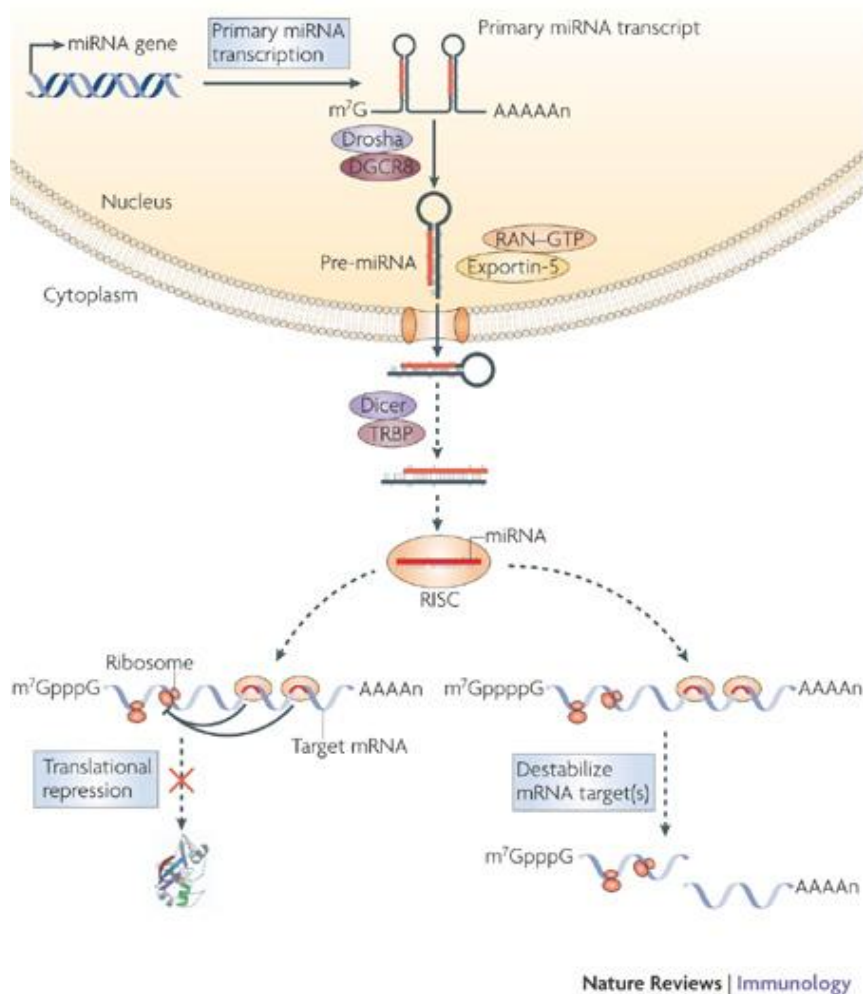


Figure 25 : Biogénèse et fonction cellulaire des miRNAs (Lodish *et al.*, 2008). Les *miRNA genes* codent pour de longs transcrits primaires de miRNA, dont la maturation nécessite une série d'étapes endonucléolytiques essentielles à la production de miRNAs fonctionnels. Dans un premier temps, les transcrits primaires de miRNA (ou « pri-miRNA ») sont épissés à l'aide de la RNase III Drosha et de son cofacteur DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*) en précurseur de mirRNA (« pre-miRNA »), qui correspond à une structure en épingle à cheveux d'une longueur d'environ 60 nucléotides. Le pre-miRNA est ensuite véhiculé activement dans le cytoplasme à l'aide de l'exportine 5 et de la molécule RAN-GTP, qui fournit l'énergie nécessaire au transport. Une fois dans le cytoplasme, le pre-miRNA subit une étape de clivage par la RNase III Dicer et son cofacteur TRBP (*TAR (HIV) RNA Binding Protein 2*), qui aboutit à la formation d'un duplex d'ARN de 21 pb de longueur, correspondant au miRNA réduit au principe actif minimal du mécanisme d'interférence à ARN, le siRNA. La dernière étape de maturation du miRNA consiste en l'incorporation du brin fonctionnel « dominant » du duplex (choisi notamment en fonction de sa stabilité) au sein du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), qui comprend les protéines argonautes AGO (non représentées sur la figure). L'action des protéines AGO diffère en fonction du degré d'homologie entre le brin fonctionnel du miRNA et la séquence d'ARNm cible : si l'appariement entre le miRNA et l'ARNm est parfait (à droite sur la figure), la protéine AGO2 intervient pour déstabiliser et cliver l'ARNm cible ; en revanche, si l'appariement est imparfait, ce sont majoritairement les protéines AGO 1, 3 et 4 qui interviennent pour inhiber la traduction protéique (répression de l'initiation de la traduction, de l'élongation ou protéolyse des peptides naissants).

Dans l'objectif d'optimiser le mécanisme endogène d'interférence à ARN, la communauté scientifique a rapidement développé des formats synthétiques d'ARN interférents, apparentés soit à des pre-miRNA (appelés *short hairpin RNA*, « shRNA »), soit à des siRNA, dont le temps de demi-vie cellulaire est plus court. Les avantages de ces formes synthétiques sont 1) une diminution des étapes de maturation et ainsi une augmentation du rendement de fonctionnement du mécanisme, 2) l'assurance d'un appariement parfait des ARN interférents avec l'ARNm cible pour orienter le mécanisme vers un clivage de cet ARNm et 3) la possibilité de cibler toute séquence d'ARNm souhaitée (l'existence de miRNAs endogènes n'ayant pas encore été montrée pour l'ensemble des transcrits cellulaires). La libération de ces séquences au sein des cellules cibles s'effectue soit sous forme d'ARN (valable pour les siRNAs et les shRNAs), soit sous forme de séquences d'ADN codant pour les ARN interférents correspondants (valable pour les shRNAs uniquement).

L'interférence à ARN est une méthode spécifique, efficace et sécuritaire grâce à l'absence de modification des séquences génomiques, qui lui confèrent un caractère réversible ; l'emploi de siRNA permet en outre un effet rapide et une pénétration facilitée dans les cellules, grâce à la faible taille des séquences correspondantes. Cependant, contrairement à la méthode de *knocking out* vue précédemment, l'interférence à ARN ne permet ni d'éteindre la totalité de l'expression d'un gène, ce qui peut être préjudiciable en cas de génotype morbide dominant négatif, ni de cibler les séquences non transcrites (promoteurs et autres séquences régulatrices). De plus, il est important de vérifier l'absence d'interférence des séquences synthétiques ciblant un gène défini avec la réponse biologique issue de l'ensemble des autres gènes cellulaires, le complexe RISC étant sollicité unanimement par les ARNs interférents endogènes et synthétiques.

L'emploi de la technologie de l'interférence à ARN est particulièrement adapté au traitement des pathologies caractérisées par une surexpression génique, telles que les cancers : une diminution de la prolifération et du caractère invasif du cancer de la vessie a ainsi été déterminée *in vitro* suite à l'utilisation de siRNAs ciblant le gène *MACC1* (*Metastasis Associated in Colon Cancer 1*, facteur activateur de transcription, en faveur de la mobilité et la prolifération cellulaires, et de la transition mésenchymo-épithéliale) (Xu *et al.*, 2015) ; des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* dans le cancer du sein, après réduction de l'expression du gène *SKP2* (*S-phase kinase-associated protein 2*, dont la protéine correspondante est impliquée dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire) par des siRNAs spécifiques (Sun *et al.*, 2015).

III- 2.2 Saut d'exon

Lorsqu'une anomalie génétique se traduit par l'apparition d'un codon stop au sein d'un exon, ou par le décalage du cadre de lecture d'une séquence, cela entraîne la synthèse d'une protéine tronquée, non fonctionnelle et souvent dégradée, voire par l'absence de synthèse protéique. L'objectif de la technique du saut d'exon

consiste, lorsque l'exon muté n'est pas indispensable à la fonction protéique, à induire une excision de cet exon lors du processus d'épissage de l'ARNm, pour éliminer les codons stop et rétablir le cadre de lecture : la protéine synthétisée est alors légèrement tronquée, mais fonctionnelle et produite à un taux similaire aux protéines sauvages.

La pathologie à l'origine du développement du saut d'exon correspond à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) : c'est une pathologie musculaire dégénérative d'origine génétique, de transmission récessive liée au chromosome X, caractérisée par une perte progressive de la fonction musculaire squelettique et cardiaque. Cette pathologie résulte de la présence d'une mutation non-sens ou d'un décalage du cadre de lecture du gène *DMD* codant pour la dystrophine, protéine d'ancrage de la matrice extracellulaire au cytosquelette *via* la F-actine, dont les sites d'action principaux se situent aux extrémités N- et C-terminales. Il est important de noter que les patients présentant des mutations du gène *DMD* n'affectant pas le cadre de lecture et permettant la synthèse d'une dystrophine partiellement fonctionnelle (absence d'acides aminés uniquement dans la partie centrale), déclarent une forme pathologique plus légère caractérisée par une fonction musculaire résiduelle, la dystrophie musculaire de Becker (BMD) : cette constatation a permis d'envisager qu'une suppression artificielle du ou des exons pathologiques du gène *DMD* pourrait permettre de réduire les symptômes de la DMD à ceux de la BMD (Negishi *et al.*, 2014) (Figure 26).

Le mécanisme de la délétion par saut d'exon consiste en une hybridation de l'ARNm défectif avec des séquences d'ARN ou d'ADN (oligonucléotides) antisens, qui lui sont complémentaires. Ces séquences se fixent spécifiquement au niveau de régions nécessaires au processus d'épissage, telles que les sites d'épissage 5' et 3' des introns, ou les séquences de reconnaissance des exons (régions exoniques nécessaires à l'épissage des introns situés en amont, et à l'inclusion des exons dans l'ARNm mature) (Pramono *et al.*, 1996 ; Wilton *et al.*, 1999). Après hybridation, les séquences antisens empêchent les interactions ARN-ARN et ARN-protéines nécessaires à l'épissage, et « masquent » ainsi l'exon correspondant au spliceosome (complexe ribonucléoprotéique responsable du processus d'épissage) : ce dernier n'est pas intégré à l'ARNm mature (Dunkley *et al.*, 1998).

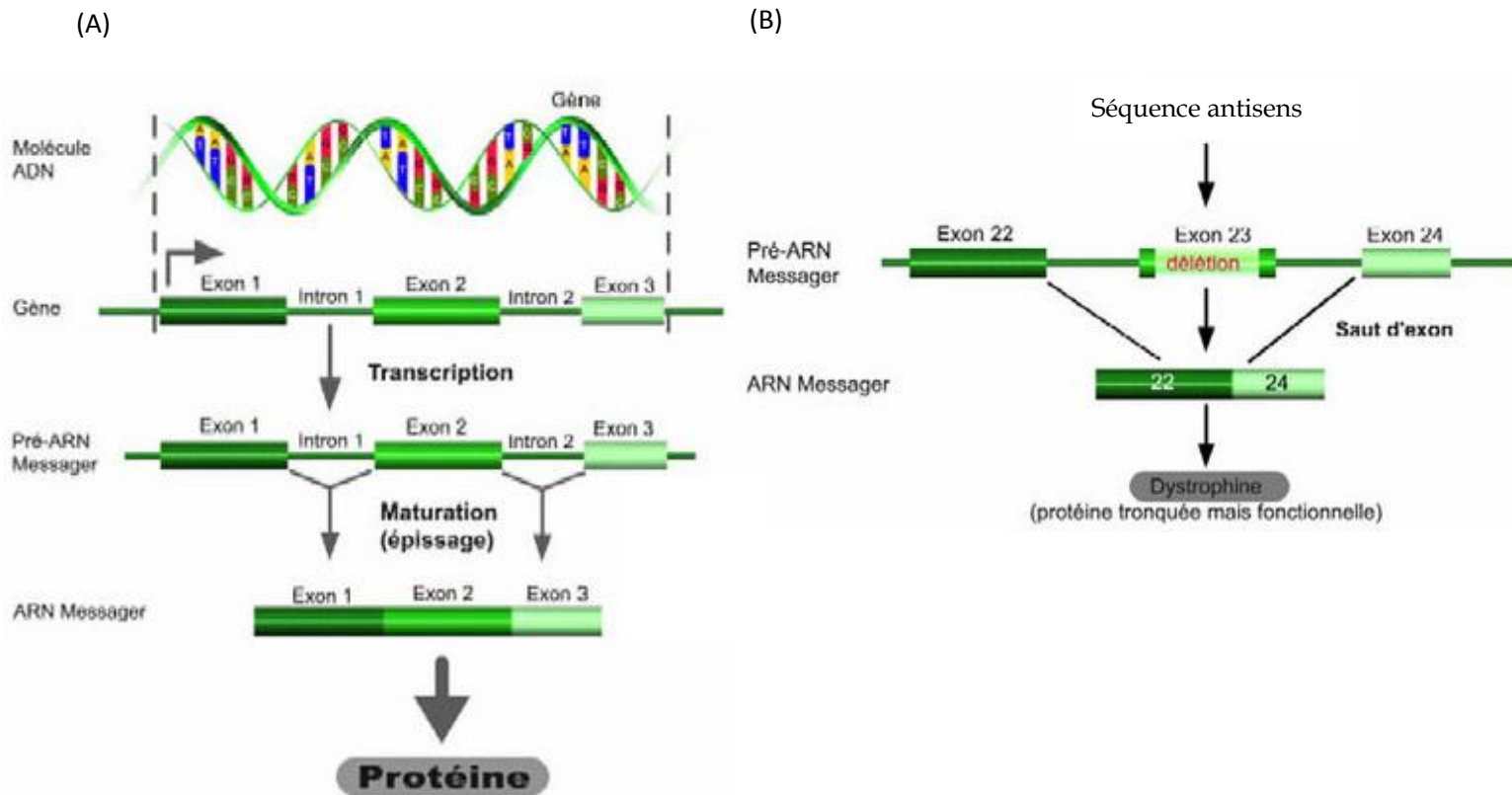


Figure 26 : Principe de la technique du saut d'exon (d'après Futura-Sciences, consulté le 13.09.15).

A) Processus de synthèse des protéines à partir de l'ADN. Après transcription de l'ADN en pré-ARNm, ce dernier subit une étape d'épissage nécessaire à sa maturation, consistant en une suppression des introns et une liaison des exons entre eux ; l'ARNm ainsi formé est alors « lu » par les ribosomes qui permettent l'assemblage des acides aminés en protéine correspondante. B) Mécanisme du saut d'exon, exemple d'une mutation dans l'exon 23 du gène codant pour la dystrophine chez le modèle murin *mdx* de la dystrophie musculaire de Duchenne. L'administration d'une séquence complémentaire de l'exon 23 inhibe son épissage par le spliceosome, ce qui provoque sa délétion de l'ARNm mature. La perte de l'exon 23 entraîne la synthèse d'une dystrophine tronquée, mais fonctionnelle car cet exon n'est pas indispensable à sa fonction.

L'efficacité de ce système a fait ses preuves *in vitro* et *in vivo* dans la délétion de l'exon 51 du gène *DMD* humain, y compris au cours d'essais cliniques réalisés chez des patients éligibles pour ce type de correction (Cirak *et al.*, 2011). A présent, les différentes études en cours concernant l'application du saut d'exon dans la DMD se concentrent sur l'augmentation de l'efficacité de délivrance des séquences antisens, afin d'optimiser l'expression de la dystrophine dans les cellules musculaires des patients ; des efforts sont également déployés pour élargir l'application de cette technologie à d'autres exons, tels que les exons 8, 44, 45, 50, 52, 55 et 53, les recherches concernant ce dernier ayant atteint le stade clinique de phase I (Sarepta Therapeutics, consulté le 08.10.15). En parallèle, d'autres applications de la technologie antisens d'interférence avec l'épissage se développent, notamment dans l'atrophie musculaire spinale (Meyer *et al.*, 2009).

III- 2.3 *Trans*-lecture de codon stop prématuré

Une alternative à la technologie du saut d'exon a été développée au début des années 2000, pour les pathologies d'origine génétique causées par la présence d'une mutation non-sens dans la séquence d'un gène : la *trans*-lecture de codon stop prématuré. Cette méthode, à la limite du concept de thérapie génique, consiste à outrepasser la présence du codon stop prématuré pathologique (appelé *Premature Termination Codon*, PTC) sur l'ARNm pendant la lecture de la séquence par les ribosomes, afin d'aboutir à la synthèse d'une protéine fonctionnelle, de taille normale.

Dans un premier temps, les études de *trans*-lecture de codon stop prématuré se sont focalisées sur l'utilisation de la gentamicine, un antibiotique de la classe des aminosides, administrée à des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne et de mucoviscidose caractérisés respectivement par une mutation non-sens des gènes *DMD* et *CFTR*. Si le traitement a induit la synthèse de protéines de taille normale chez les patients, le bénéfice clinique de la gentamicine reste limité par une faible efficacité, d'importantes néphro- et ototoxicité, et la nécessité d'une administration intraveineuse ou intramusculaire (Welch *et al.*, 2007).

Ces contraintes ont été dépassées en 2007, après la découverte de l'efficacité d'une autre molécule chimique : le 3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4]oxadiazol-3-yl]-benzoic acid, identifié sous le nom de PTC124 ou Ataluren. C'est une molécule dont la structure n'est pas apparentée aux aminosides – il ne présente donc pas leurs effets indésirables –, et qui affiche une biodisponibilité correcte par voie orale en suspension aqueuse (Welch *et al.*, 2007). Le PTC124 fonctionne par interaction avec les ribosomes lors de la traduction des protéines, sans interférence avec le taux de transcription ou la stabilité des ARNm, qu'ils soient mutés ou sauvages. Son efficacité a été cliniquement démontrée chez des patients atteints de DMD, conduisant l'Agence Européenne du Médicament à délivrer en 2014 à la société productrice (PTC Therapeutics) une autorisation conditionnelle de mise sur le marché de l'Ataluren sous le nom de spécialité Translarna™, pour le traitement de la DMD résultant d'une mutation non-sens du gène codant pour la dystrophine, chez des patients ambulatoires âgés de 5 ans et plus. Des études cliniques se poursuivent pour confirmer l'efficacité du PTC124 dans le traitement de la DMD, et pour étendre les indications du produit au traitement de patients atteints de mucoviscidose consécutive à une mutation non-sens du gène *CFTR* (Haas *et al.*, 2015 ; PTC Therapeutics, consulté le 14.09.15).

La *trans*-lecture de codon stop prématuré, dont le produit thérapeutique correspondant présente l'avantage d'une administration orale et d'un effet génomique contrôlé et sécuritaire, constitue donc un espoir de thérapie pharmacologique pour améliorer l'expression génique de patients atteints de pathologies génétiques à mutation non-sens.

III- 2.4 *Trans*-épissage

Au sein des cellules des animaux supérieurs, le processus d'épissage d'une molécule de pré-ARNm par le spliceosome se traduit par l'excision d'une séquence intronique suivie de la ligation de deux exons adjacents, au sein de la même molécule de pré-ARNm (Figure 26) : ce mécanisme est appelé *cis*-épissage.

Un mécanisme d'épissage alternatif, le *trans*-épissage, a cependant été découvert en 1986 chez le trypanosome (Murphy *et al.*, 1986 ; Sutton and Boothroyd, 1986). Le *trans*-épissage consiste en la recombinaison, sous le contrôle du spliceosome, d'une molécule de pré-ARNm endogène avec une molécule d'ARN exogène appelée « molécule de pré-*trans*-épissage » (*pre-trans-splicing molecule*, PTM). La méthode globale de *trans*-épissage est appelée technologie SMaRT, pour *Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing*.

L'intérêt thérapeutique de ce mécanisme a rapidement été identifié : le *trans*-épissage permet de remplacer une partie mutée d'une séquence de pré-ARNm par la séquence sauvage correspondante apportée par la PTM, afin de générer un nouvel ARNm recombinant dépourvu de mutation (Figure 27). Cette technique est applicable quelle que soit la nature de la mutation ciblée, et quelle que soit sa position au sein du pré-ARNm endogène.

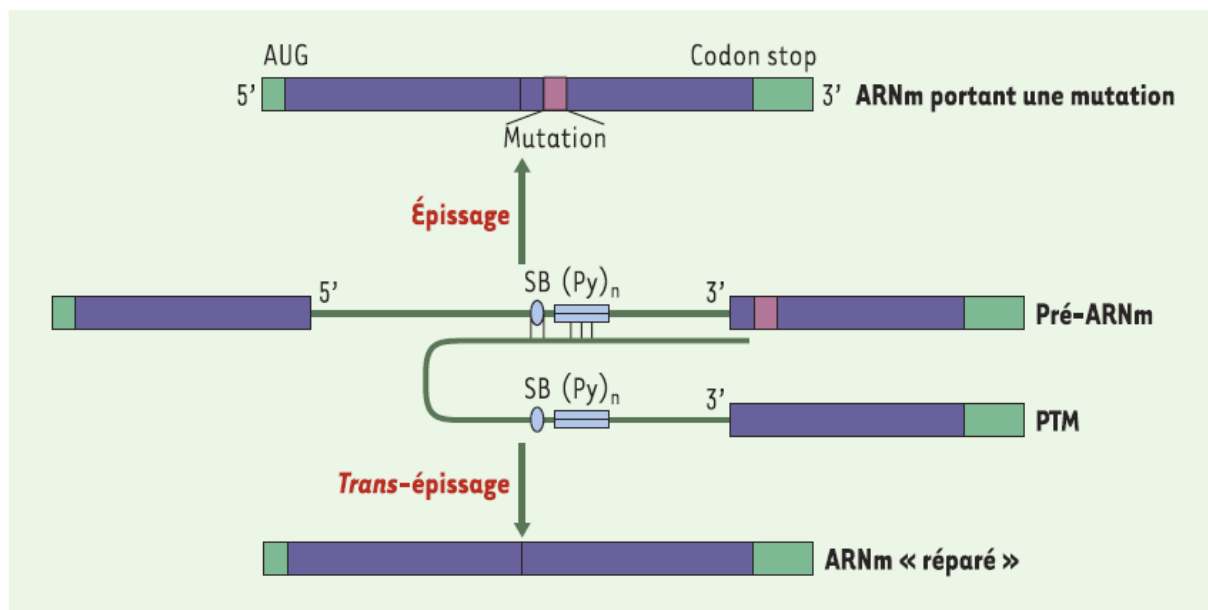


Figure 27 : Mécanisme du *trans*-épissage (Corcos and Solier, 2005). Dans cet exemple, le pré-ARNm comprend deux exons ; le second exon présente une mutation (barre pourpre). L'apport de PTM permet la suppression de la mutation en remplaçant l'exon muté : la PTM se lie au pré-ARNm endogène par appariement de séquences, ce qui masque le site 3' d'épissage endogène ; la réaction de *cis*-épissage est donc bloquée, et le domaine de *trans*-épissage de la PTM peut jouer le rôle d'un site 3' d'épissage. SB : site de branchement nécessaire à la formation de la structure en lasso de l'intron au cours de l'épissage ; (Py)_n : étendue de poly-pyrimidines, impliquée dans la reconnaissance des jonctions exon-intron.

Une réparation fonctionnelle de l'ARNm *via* la technologie de *trans*-épissage a été rapportée dans de nombreuses études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Les études les plus récentes montrent des résultats favorables pour le traitement de différents cancers, tels que la leucémie lymphoïde aiguë (correction de la mutation CD22ΔE12), ainsi que le cancer colorectal et le carcinome hépatocellulaire, pour lesquels une correction de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription p53 (impliqué dans la régulation du cycle cellulaire) par *trans*-épissage a conduit à une réduction significative de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, un arrêt du cycle cellulaire et une entrée des cellules en apoptose (He *et al.*, 2015a ; He *et al.*, 2015b ; Uckun *et al.*, 2015).

Outre ses applications thérapeutiques directes, la technologie SMaRT a récemment été dérivée pour faciliter la délivrance de longs transcrits par des vecteurs à faible capacité d'encapsulation : l'équipe de Truong a ainsi développé un système de délivrance par des vecteurs AAV recombinants de la séquence codant pour la protéine Cas9 scindée en deux, chaque moitié de séquence Cas9 étant fusionnée à des fragments jouant le rôle de domaines de *trans*-épissage. Après co-expression des pré-ARNm fusionnés au sein de la cellule, l'intervention du spliceosome a permis de reconstituer *in situ* l'ARNm mature correspondant à la Cas9, montrant après traduction une activité catalytique comparable à celle de la Cas9 sauvage (Truong *et al.*, 2015).

IV- Aspects réglementaires

IV- 1 Réglementation des médicaments de thérapie innovante

A côté des produits biologiques traditionnels tels que les préparations cellulaires et produits transfusionnels, de nouveaux outils thérapeutiques issus de l'ingénierie génétique et cellulaire se sont développés à la fin du XX^e siècle : les produits de thérapie génique et thérapie cellulaire. Ces produits faisant l'objet de différents statuts au sein de l'Union Européenne, liés notamment à l'importante hétérogénéité de leur origine, leur mécanisme d'action, leurs indications et leur rapport bénéfice/risque, la mise en place d'un encadrement réglementaire s'est alors imposée.

La Commission Européenne a répondu à cette demande par l'intermédiaire de la directive 2003/63/EC relative aux médicaments à usage humain, qui modifie la directive 2001/83/EC. La partie IV de l'annexe I de cette nouvelle directive établit le statut des produits de thérapie génique et cellulaire en tant que médicaments biologiques, appartenant à une nouvelle catégorie dénommée « Médicaments de Thérapie Innovante » (MTI), qui leur est dédiée.

Le médicament de thérapie génique est alors défini comme suit :

a) sa substance active contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique

ET

b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou du produit de l'expression génétique de cette séquence (ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, consulté le 14.08.15a).

En 2007, les textes communautaires concernant les MTI ont été complétés par le règlement européen 1394/2007, relatif aux médicaments de thérapie innovante. Ce texte propose une visibilité réglementaire tout en assurant suffisamment de flexibilité pour s'adapter aux progrès scientifiques ; il a pour objectif d'harmoniser et faciliter l'accès au marché de ces nouveaux médicaments et de stimuler la compétitivité de l'industrie des biotechnologies tout en garantissant un haut niveau de protection de la santé. Le règlement 1394/2007 est une *lex specialis* : il ne déroge pas aux principes fondamentaux des textes précédents s'appliquant aux MTI, dont la directive 2003/63/EC et la directive 2004/23/EC (qui s'applique pour le don, l'obtention et le contrôle, du tissu ou des cellules qui serviront de matériau de départ à l'élaboration et la production du MTI), mais il introduit des exigences supplémentaires. Ce document définit également les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les produits issus de l'ingénierie tissulaire ou cellulaire et les produits combinant dispositifs médicaux et cellules ou tissus comme appartenant aux MTI (ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, consulté le 14.08.15b).

En ce qui concerne les essais cliniques, qui sont nécessaires à l'évaluation de l'efficacité, de la sécurité et de l'effet thérapeutique potentiel *in vivo* de la méthode de transfert génique (Morishita, 2015), ils ne dérogent pas aux particularités inhérentes aux MTI. En effet, si les essais cliniques concernant ces médicaments sont soumis à la réglementation européenne relative à l'ensemble des médicaments à usage humain (directive 2001/20/EC), les particularités des MTI ont justifié la publication de bonnes pratiques cliniques (BPC) adaptées (« Bonnes pratiques cliniques spécifiques aux MTI ») qui ne remplacent pas les BPC classiques mais apportent des exigences et adaptations complémentaires à celles-ci (ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, consulté le 14.08.15a).

Quant à la mise sur le marché de ces médicaments, le règlement 1394/2007 impose un accès au marché de l'ensemble des Etats-Membres de l'Union Européenne via une procédure d'autorisation de mise sur le marché (AMM) centralisée : l'AMM octroyée par la Commission Européenne s'impose dans tous les pays de l'Union Européenne. Afin d'améliorer l'évaluation de ces médicaments innovants lors de l'instruction de leur AMM, le règlement 1394/2007 définit également la mise en place d'un Comité des Médicaments de Thérapie Innovante (CAT, *Committee for Advanced Therapies*) à l'Agence Européenne du Médicament : au travers d'expertises spécifiques, le comité assure un niveau élevé d'évaluation scientifique dans tous les

domaines que couvrent les MTI (bioingénierie, biologie cellulaire et moléculaire, production biologique, toxicologie, pharmacologie et immunopharmacologie, essais cliniques).

IV- 2 Cas particulier des médicaments de thérapie génique : les OGM

Un OGM, ou Organisme Génétiquement Modifié, correspond à un organisme vivant dont le patrimoine génétique a été modifié par intervention humaine, afin de lui conférer de nouvelles propriétés. Or, comme nous l'avons vu précédemment, certaines approches de thérapie génique résultent de la modification génomique de vecteurs vivants (virus recombinants) ; cela implique leur classification, et celle des médicaments de thérapie génique correspondants, dans la catégorie des OGM.

Au vu des risques et du danger liés à la dissémination et à la transmission non contrôlées de ces organismes génétiquement modifiés chez des êtres vivants, la mise en place d'un encadrement réglementaire renforcé s'est imposée à la communauté scientifique. Elle s'est traduite en 2008 par la création d'un conseil dédié aux biotechnologies et en particulier aux OGM, le Haut Conseil des Biotechnologies (HCB). Placé sous l'égide des ministères en charge de l'Environnement, de l'Agriculture, de la Recherche, de la Santé et de la Consommation, le HCB est une instance indépendante destinée à éclairer la décision publique en formulant des avis sur toutes questions intéressant les OGM et autres biotechnologies. Avec l'aide de son Comité Scientifique et de son Comité Economique, Ethique et Social, le HCB évalue les risques des biotechnologies pour l'environnement et la santé publique, et analyse les aspects sociétaux des biotechnologies et de leurs applications (*Haut Conseil des Biotechnologies, consulté le 09.09.15*).

En ce qui concerne les médicaments de thérapie génique, deux avis du HCB sont requis pour la mise en place d'un essai clinique impliquant des produits identifiés comme OGM :

- l'avis de classement du médicament de thérapie génique (en termes de risques liés au produit) et la mesure de confinement à mettre en œuvre pour sa manipulation. Ce premier avis est sollicité par le promoteur d'un essai clinique ; il précède obligatoirement la demande d'autorisation de l'essai clinique car il doit être joint au dossier.

- l'agrément des sites impliqués dans l'essai clinique et la durée des mesures de confinement à laquelle le patient devra être soumis après inoculation du médicament de thérapie génique. Ce deuxième avis est sollicité directement par l'ANSM lors de l'évaluation du dossier d'essai clinique (*ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, consulté le 14.08.15a*).

ETUDES EXPERIMENTALES

Chapitre 1 : Introduction et Contexte des travaux

I- Structuration de l'équipe de recherche

Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés dans le cadre de mon stage de Master 2 Recherche, intitulé « Biotechnologie pharmaceutique et thérapies innovantes ». Ce stage s'est déroulé au sein de l'Unité Inserm U1035 « Biothérapie des Maladies Génétiques et Cancers », qui est située dans les locaux de l'Université de Bordeaux, sur le campus accueillant les UFRs de Médecine et de Pharmacie.

Cette unité est dirigée par le Professeur Hubert de Verneuil (PU-PH), et se divise en 2 équipes. L'équipe 1 a pour thématique principale l'étude du transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques et épidermiques, sous la responsabilité du Professeur Hubert de Verneuil ; cette équipe est elle-même divisée en 2 groupes de recherche, les groupes Biothérapie et Dermatologie. L'équipe 2, quant à elle, a pour sujet d'étude l'hématopoïèse leucémique et ses nouvelles cibles thérapeutiques, sous la responsabilité du Professeur François-Xavier Mahon (PU-PH). L'unité Inserm U1035 accueille également un programme ATIP-AVENIR en immuno-dermatologie et une plateforme de vectorologie, la plateforme de services de la SFR Transbiomed.

Le projet de recherche à l'origine de ce mémoire résulte d'une conjonction entre l'activité hospitalière de deux chercheurs du groupe Biothérapie, Emmanuel Richard (MCU-PH) et Jean-Marc Blouin (MCU-PH), qui sont au contact de patients atteints d'hyperoxalurie primitive de type 1, à laquelle s'ajoutent l'expertise du laboratoire envers les cellules souches pluripotentes induites et l'intérêt croissant de l'Unité envers les nouveaux outils de manipulation génétique dirigée. Les travaux présentés ont été réalisés sous la responsabilité d'Emmanuel Richard et de Jean Marc Blouin.

II- Emergence du projet dans un contexte de traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1 par thérapie génique

I- 1 Choix de la stratégie développée

Nous avons vu dans les généralités que d'après les caractéristiques de la PH1, et compte tenu des contraintes liées aux traitements actuellement disponibles, le développement d'une stratégie de correction des anomalies génétiques morbides pourrait présenter une alternative thérapeutique prometteuse. Dans le cas de la PH1, l'objectif des stratégies développées correspond à la correction d'une proportion

suffisante de cellules hépatiques pour permettre une réduction de la production d'oxalate, et atteindre des quantités excrétables sans dommage par le rein.

Dans un premier temps, plusieurs études de transduction hépatique par des vecteurs viraux porteurs d'une copie du gène *AGXT* sauvage ont été menées (vecteurs adénoviraux et viraux associés aux adénovirus), conduisant à la restauration de l'activité enzymatique de l'AGT dans un modèle de souris KO *Agxt*^{-/-} (Salido *et al.*, 2006 ; Salido *et al.*, 2011). Cependant, dans cette pathologie où les hépatocytes non corrigés continuent à produire de l'oxalate et conservent ainsi leur fonction toxique pour l'organisme, l'atteinte de l'objectif thérapeutique chez l'être humain requiert la transduction d'une quantité élevée de cellules, nécessitant par conséquent l'administration de doses de vecteurs viraux significatives, susceptibles d'induire une réponse immunitaire néfaste pour l'organisme, et délétère pour la thérapie (élimination des vecteurs viraux).

Une alternative à la stratégie virale est possible par repopulation du foie affecté à l'aide de cellules hépatocytaires exprimant une version sauvage du gène *AGXT*. Cette technique, qui nécessite une irradiation hépatique préalable pour réduire la population d'hépatocytes pathologiques, a été mise en œuvre avec succès chez des souris *Agxt*^{-/-}, conduisant à la restauration de l'activité de l'AGT et à une réduction de l'excrétion urinaire d'oxalate (Guha *et al.*, 2005 ; Jiang *et al.*, 2008).

C'est cette seconde stratégie, moins invasive, contraignante et variable dans ses résultats que la greffe combinée hépatorénale, mieux contrôlée et plus sécuritaire qu'une stratégie virale *in vivo*, qu'a choisi de développer l'équipe du laboratoire à l'origine du projet de recherche, avec l'objectif de mettre au point des hépatocytes autologues génétiquement corrigés potentiellement transplantables chez les patients.

Cependant, la capacité d'approvisionnement limitée en hépatocytes humains primaires, et l'instabilité de ces cellules en culture, qui perdent rapidement leur caractère différencié et leurs fonctions spécifiques après isolement, constituent des obstacles majeurs à leur manipulation.

I- 2 Correction génique ciblée : avantage des cellules iPS

Les difficultés précédemment citées ont pu être dépassées grâce à l'expérience du laboratoire envers la culture de cellules souches pluripotentes induites. L'équipe de recherche a ainsi envisagé leur utilisation en tant qu'« intermédiaires » dans la réalisation du projet, faisant le lien entre des cellules de patients facilement manipulables et pouvant être corrigées génétiquement (en l'occurrence des fibroblastes épidermiques prélevés par biopsie), et les cellules hépatocytaires différenciées ayant conservé la modification génétique précédemment établie. Cette stratégie permet 1) de travailler avec des cellules autologues aux patients, 2) de procéder à une correction des cellules en amont de la différenciation hépatocytaire et ainsi 3) de minimiser la durée de la culture des hépatocytes.

Physiologiquement, les termes « cellules souches pluripotentes » qualifient les cellules dérivées de la masse cellulaire interne des blastocystes de mammifères, qui présentent la capacité de s'auto-renouveler en conservant leur pluripotence, c'est-à-dire la possibilité de se différencier en tout type cellulaire issu de l'un des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme) (Evans and Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Si ces propriétés laissent supposer des perspectives d'utilisation à des fins de compréhension de mécanismes pathologiques, de criblage de médicaments et de traitements biologiques, en revanche l'obtention des cellules est complexe : en effet, l'utilisation des embryons humains fait face à des controverses éthiques qui entravent les applications des cellules souches embryonnaires humaines ; de plus, en ce qui concerne la transplantation d'organes issus du développement de cellules souches embryonnaires, la problématique du rejet de greffe demeure fondamentale (Thomson *et al.*, 1998).

Un moyen de contourner ces obstacles réside en l'induction du statut de pluripotence, par reprogrammation directe de cellules somatiques différenciées. En effet, il a été montré sur des fibroblastes embryonnaires et adultes de souris tout d'abord (Takahashi and Yamanaka, 2006), puis sur des fibroblastes adultes humains (Takahashi *et al.*, 2007), qu'il est possible de reprogrammer des cellules somatiques vers un stade plus immature en induisant l'expression de plusieurs facteurs de transcription, présentant un rôle important dans le maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires : Oct3/4 et Sox2, qui sont liés au caractère pluripotent (Niwa *et al.*, 2000 ; Avilion *et al.*, 2003), et c-Myc et Klf4, qui sont impliqués dans l'auto-renouvellement (Cartwright *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2005). Les cellules ainsi obtenues ont été appelées « cellules souches pluripotentes induites » ou iPSCs, *induced Pluripotent Stem Cells* (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Lors de la mise au point des iPSCs à partir de fibroblastes humains (Takahashi *et al.*, 2007), l'expression des facteurs de pluripotence Oct3/4, Sox2, Klf4, et c-Myc a été induite par transduction de cellules somatiques à l'aide de vecteurs rétroviraux recombinants ; cette méthode s'accompagne d'un risque de mutagenèse insertionnelle, liée à de potentielles intégrations aléatoires du génome viral dans les cellules hôtes. Depuis, différentes techniques non intégratives ont été développées, telles que la transfection cellulaire de plasmides épisomaux (Mack *et al.*, 2011), la mise en présence de petites molécules se substituant aux facteurs de pluripotence (Hou *et al.*, 2013) ou la transduction cellulaire par des vecteurs viraux Sendai recombinants (Ye *et al.*, 2013). Les virus Sendai appartiennent à la famille des *Paramyxoviridae* ; ce sont des virus à ARN monocaténaire linéaire de polarité négative, dont la réplication s'effectue entièrement dans le cytoplasme cellulaire et dont le génome ne s'intègre pas dans celui de la cellule-hôte (Lamb and Kolakofsky, 2001 ; Li *et al.*, 2000).

Malgré les risques de réversion et de recombinaison liés à leur origine virale, les vecteurs Sendai présentent un intérêt significatif pour le projet. En effet, il a été

montré que ces vecteurs se caractérisent par une efficacité de transduction importante (Fujita *et al.*, 2006), et que leur version recombinante, pourvue des transgènes codant pour les facteurs Oct4, Sox2, Klf4, et c-Myc, est capable d'induire la reprogrammation de fibroblastes dermiques humains en iPSCs (Kawagoe *et al.*, 2013). Ces outils ont donc été choisis par l'équipe de recherche pour reprogrammer les fibroblastes épidermiques prélevés chez les patients ; les risques de recombinaison et de réversion inhérents aux virus seront néanmoins pris en considération.

III- Structure du projet de recherche

La finalité du projet de recherche consiste en la correction phénotypique de cellules hépatocytaires autologues, dérivées de cellules souches pluripotentes induites elles-mêmes reprogrammées à partir de fibroblastes épidermiques génétiquement modifiés. Les fibroblastes étudiés sont issus de deux patients suivis en néphropédiatrie à l'hôpital des enfants de Bordeaux : l'un des patients est hétérozygote composite, caractérisé par les mutations G170R/C173Y (C : cystéine, G : glycine, R : arginine, Y : tyrosine) situées dans l'exon 4 de la protéine AGT, et issues respectivement des substitutions c.508G>A et c.518G>A du gène AGXT humain ; le second patient est homozygote pour la mutation I244T (I : isoleucine, T : thréonine) située dans l'exon 7 de l'AGT et issue de la substitution c.731T>C du gène AGXT humain. Le prélèvement des cellules a été réalisé selon les règles d'éthique appropriées, après consentement éclairé des patients et de leur famille.

Si le choix des sujets de l'étude comprend un aspect pragmatique, les substitutions c.508G>A et c.731T>C se démarquent de l'ensemble des mutations répertoriées par le potentiel thérapeutique lié à leur correction. En effet, la substitution c.508G>A d'une part, constitue la mutation du gène AGXT la plus commune, présente chez 24 à 37% des patients selon les études ; de plus, si la protéine AGT^{G170R} est adressée vers la mitochondrie où elle est incapable de métaboliser le glyoxylate, son activité intrinsèque est conservée à plus de 40% (Purdue *et al.*, 1990 ; Williams *et al.*, 2009). D'autre part, la substitution c.731T>C représente la deuxième mutation la plus commune retrouvée chez les patients atteints de PH1, et la protéine AGT^{I244T} correspondante présente une sensibilité aux chaperons pharmacologiques qui limitent l'agrégation responsable de son inactivation (Santana *et al.*, 2003). Il est donc envisageable que la correction génique de ces anomalies, potentiellement combinée à des traitements pharmacologiques, puisse améliorer le phénotype de nombreux patients souffrant de PH1.

Deux approches ont été envisagées pour modifier génétiquement les fibroblastes, basées sur la réparation de cassures de l'ADN par recombinaison homologue : 1) une approche « universelle », impliquant l'insertion de la séquence d'ADNc du gène AGXT humain natif dans la région 5'UTR endogène, à l'aide de

TALENs et d'une cassette de recombinaison homologue, et 2) une approche spécifique, consistant en la substitution des bases mutées du gène *AGXT*, grâce à l'intervention de systèmes CRISPR/Cas9 et d'une matrice oligodésoxyribonucléotidique simple brin. Ces deux approches sont complémentaires : la thérapie additive ciblée impliquant les TALENs est indépendante des types de mutations affectant le gène *AGXT*, elle convient donc potentiellement à tous les patients ; ce n'est pas le cas de la correction génique ciblée par le système CRISPR/Cas9, qui doit être adaptée à chaque mutation, mais qui présente l'avantage d'être plus simple à développer que la méthode précédente, et qui n'implique pas l'insertion de séquence additionnelle au sein du génome cellulaire.

Finale­ment, le projet est structuré comme suit : tout d'abord, les fibroblastes prélevés chez les patients seront modifiés gé­néti­que­ment à l'aide des outils de correction gé­néti­que ciblée, puis ces cellules seront reprogrammées en iPSCs à l'aide de vecteurs viraux Sendai porteurs des transgènes codant pour les facteurs de pluripotence Oct3/4, Sox2, Klf4, et c-Myc. Après sélection clonale, les iPSCs gé­néti­que­ment corrigées seront enfin orientées vers la lignée hépatocytaire par introduction, dans leur milieu de culture, de combinaisons de cytokines mimant la différenciation embryonnaire au sein du feuillet endodermique. Ce protocole est maîtrisé au laboratoire, et a déjà conduit à l'obtention de cellules hépatocytaires parfaitement caractérisées.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I- Développement des outils de manipulation génétique ciblée

I- 1 Correction génique « universelle » à l'aide des TALENs

L'objectif est de développer une cassette d'expression génique universelle, contenant une copie fonctionnelle de l'ADNc AGXT, potentiellement applicable à une large population de patients sans restriction à certains génotypes mutés. La cassette sera ensuite introduite dans la région 5'UTR (*UnTranslated Region*, région transcrite non traduite) du gène AGXT par recombinaison homologue dirigée, à l'aide de TALENs (Figure 28).

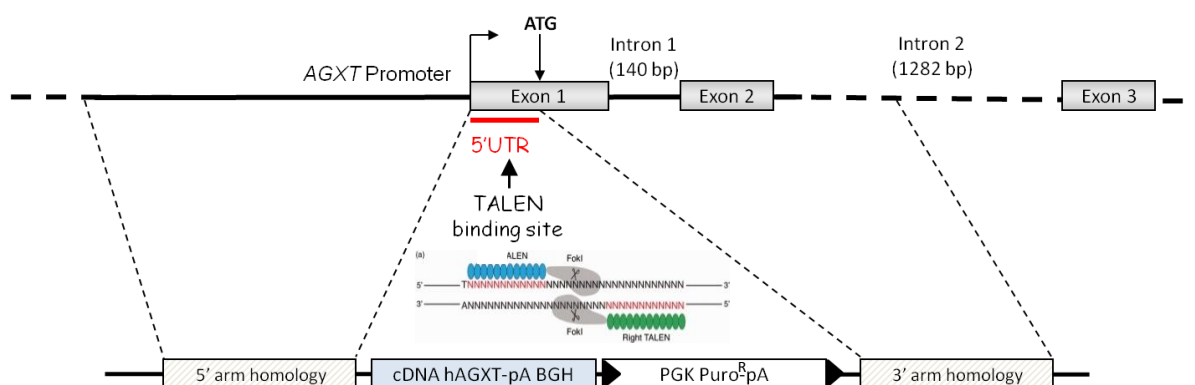


Figure 28 : Représentation de la correspondance entre cassette d'expression et séquence cible, avant recombinaison homologue assistée par les TALENs. En haut : séquence nucléotidique cible ; en bas : cassette d'expression contenant, entre les deux séquences d'ADN homologues à la cible (5' et 3' arm homology), l'ADN complémentaire du gène AGXT humain sauvage (cDNA hAGXT) suivi du signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (pA BGH, *Bovine Growth Hormone*), ainsi qu'un gène de résistance à la puromycine (Puro^R-pA ; la puromycine étant un inhibiteur de la traduction cellulaire) sous contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK). L'ensemble PGK Puro^R-pA est flanqué de séquences LoxP (triangles noirs) pouvant être reconnues par des recombinases Cre ; ce système permet d'exciser spécifiquement le gène de résistance à la puromycine de la cassette recombinée, après induction de l'expression des recombinases Cre dans le cytoplasme cellulaire. Il faut noter également que la séquence cible des TALENs en 5'UTR du cDNA AGXT a été supprimée, afin de réduire le risque de clivage de la cassette recombinée.

Le clivage double-brin de la région 5'UTR du gène AGXT endogène par les TALENs est destiné à favoriser le mécanisme de recombinaison homologue entre la cassette et sa cible, conduisant à l'intégration du transgène dans le génome cellulaire. La région 5'UTR est commune à l'ensemble des patients atteints de PH1, quelles que soient les mutations à l'origine de la pathologie ; la cassette thérapeutique est donc appropriée pour le traitement de la majorité des patients.

Le segment de la cassette correspondant à l'ADNc du gène *AGXT* sauvage n'est associé à aucun promoteur exogène ; en effet, la position de ce segment en 5'UTR après recombinaison permet son contrôle par le promoteur endogène du gène *AGXT*, tandis que l'expression du gène endogène est éteinte. Grâce à cette stratégie, l'expression du transgène sera régulée de manière physiologique au sein des cellules hépatocytaires, le promoteur du gène *AGXT* étant spécifique du tissu hépatique.

La présence du gène de résistance à la puromycine permet la sélection des cellules recombinées, par culture en présence de l'antibiotique. La possibilité d'une excision de ce gène, par induction du système Cre/Lox, permet de faciliter l'application des cellules génétiquement modifiées chez l'Homme : en effet, l'administration de gènes de résistance aux antibiotiques n'est pas permise chez l'Homme, à moins de justifier l'absence d'utilisation d'une procédure de sélection alternative, de s'assurer que le produit testé ne sera pas excrété dans l'environnement, et de démontrer l'intérêt majeur du produit et des essais cliniques envisagés.

I- 1.1 Développement des TALENs

La séquence protéique des TALENs est dépendante de la séquence nucléotidique de la région génomique à cibler, comme nous l'avons vu précédemment. A ce paramètre, s'ajoutent des critères essentiels à respecter dans la construction : les séquences cibles des monomères de TALENs doivent être séparées par 12 à 21pb, et précédées d'une thymine à leur extrémité 5', qui est reconnue par deux repliements cryptiques de la région N-terminale des TALEs ; la longueur totale de la séquence reconnue par le dimère de TALENs doit être supérieure à 20 pb, séquence de séparation exclue (Kim and Kim, 2014 ; Miller *et al.*, 2011 ; Reyon *et al.*, 2012).

Dans le cadre du projet, les plasmides d'expression des TALENs ont été développés en collaboration avec l'équipe du Dr Jean-Paul CONCORDET, directeur de la plateforme TALGENE (Institut Cochin, Paris). Les caractéristiques du ciblage par les protéines correspondantes sont indiquées dans la figure 29.

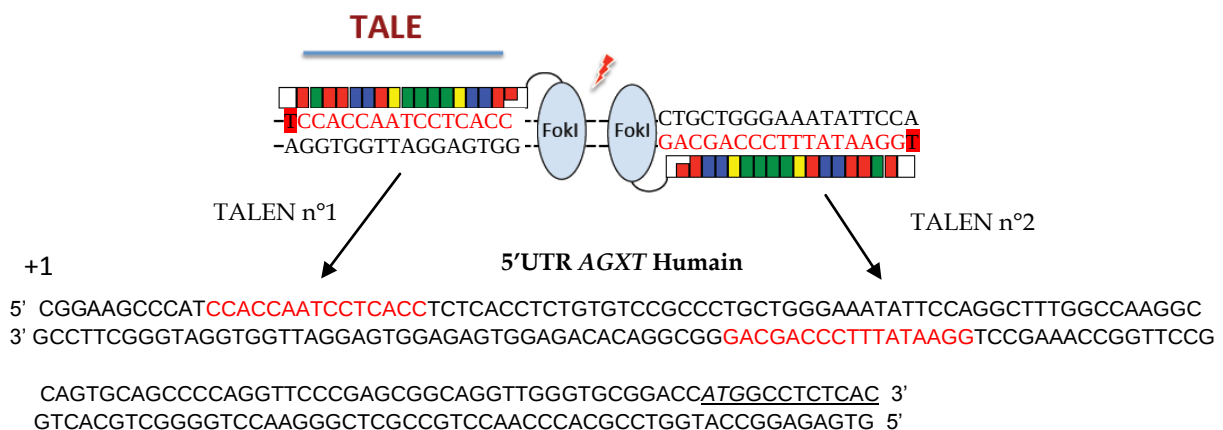


Figure 29 : Hybridation des TALENs à leur séquence cible, la région 5'UTR du gène *AGXT* humain (d'après une figure créditée par Jean-Paul ConcorDET). Les flèches indiquent la position du site

d'hybridation (séquence nucléotidique rouge) de chaque monomère de TALENs sur la région 5'UTR AGXT. La figure étant une adaptation, la couleur des rectangles représentant le RVD de chaque séquence protéique répétée ne correspond pas aux nucléotides composant la séquence cible. Surlignage rouge : thymine en 5' de la séquence cible de chaque monomère de TALENs. Les sites d'initiation de la transcription du 5'UTR (+1) ainsi que le codon initiateur de la traduction (ATG) sont également indiqués ; la partie soulignée correspond à la portion de la séquence du 5'UTR traduite en protéine AGT. Le symbole « éclair » représente la position du site de clivage de l'ADN cible par les TALENs.

L'efficacité de clivage des TALENs au niveau du site 5'UTR AGXT cible a été évaluée *in vitro* dans des cellules de la lignée HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) par l'équipe de recherche, avant mon arrivée au laboratoire : les résultats obtenus montrent un clivage correct de la cible, qu'elle soit présente de façon endogène (génome cellulaire) ou exogène (cassette introduite dans le cytoplasme cellulaire) (données non publiées).

I- 1.2 Construction de la cassette de recombinaison

Les éléments qui composent la cassette de recombinaison (vus en figure 28) ont été assemblés et introduits par génie génétique dans le plasmide vecteur de transfection p1180. Ce plasmide, disponible au laboratoire, est composé d'un site multiple de clonage, d'un gène de résistance à l'ampicilline et de l'origine de réplication procaryote OriC d'*Escherichia coli* ; il présente une taille de 3422 pb. Les étapes de la construction sont résumées dans la figure 30.

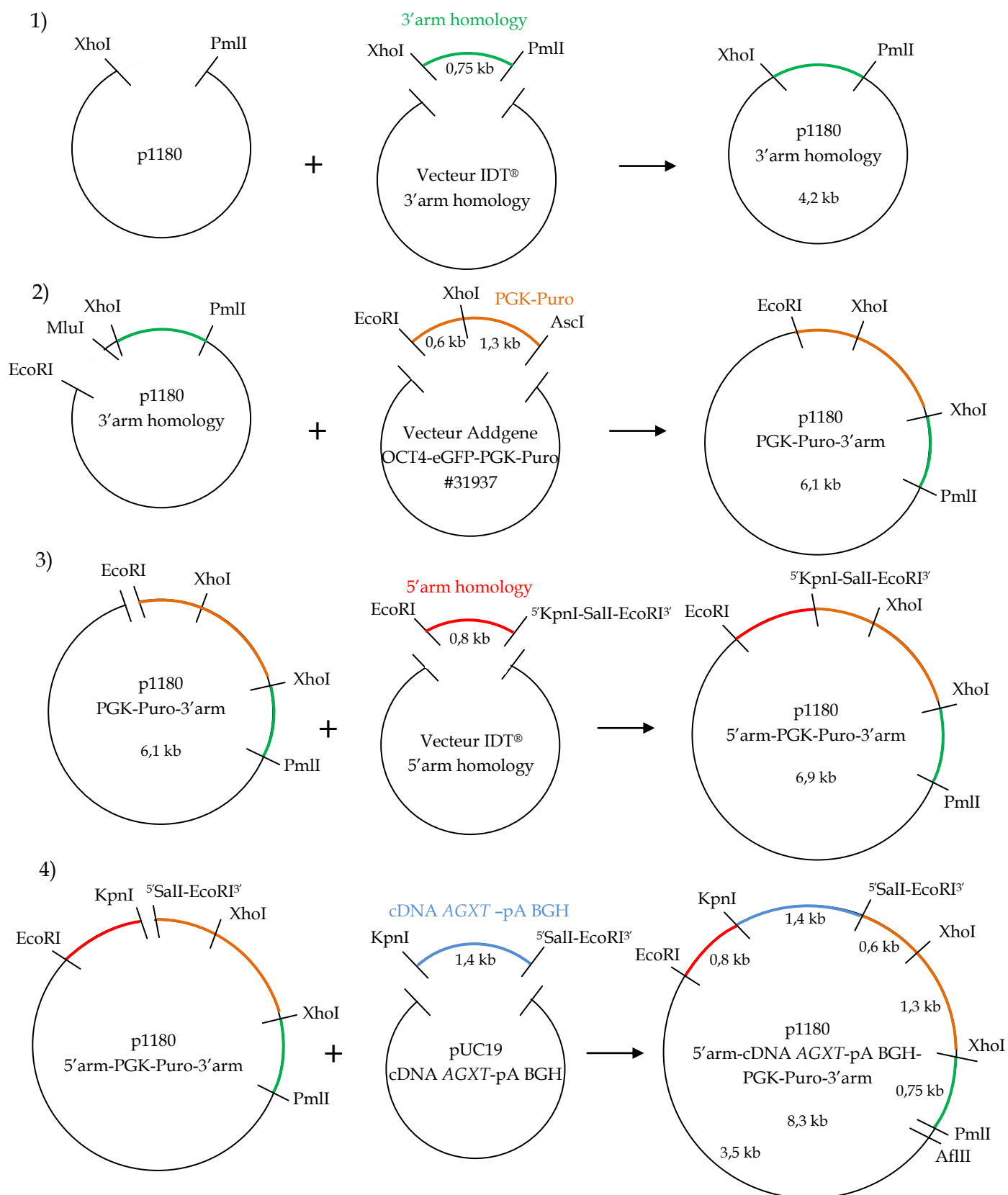


Figure 30 : Etapes de développement de la cassette de recombinaison homologue. Les sites de restriction des enzymes employées (fournisseur BioLabs® Inc.) sont les suivants : AflIII : 5'CTTAGG3'; AscI : 5'GG^CGCGCC3'; EcoRI : 5'G^AATTC3'; KpnI : 5'GGTAC^C3'; MluI : 5'A^CGCGT3'; PmlI : 5'CAC^GTG3'; SalI : 5'G^TCGAC3'; XhoI : 5'C^TCGAG3'. Les tailles mentionnées correspondent à la longueur de chaque

séquence située entre deux sites de restriction. Les séquences clivées par *AscI* et *MluI* présentent des extrémités cohésives compatibles (étape 2) ; en revanche, après ligation des fragments, les deux sites de restriction disparaissent. Le site de restriction *AflIII*, indiqué uniquement dans la dernière construction afin de ne pas alourdir les figures, appartient au plasmide p1180 ; de même, le gène de résistance à l'ampicilline et l'origine de répllication procaryote *OriC*, bien que non représentés, figurent dans la partie noire du schéma du p1180.

A chaque étape, les fragments hydrolysés ont été ligués par action de la T4 DNA Ligase (BioLabs® Inc.), en présence d'ATP. En vue de leur amplification et de leur caractérisation par mini-préparation, les produits de ligation ont été introduits par électroporation dans des bactéries électrocompétentes *Escherichia coli* de souche STBL2 (dispositif MicroPulser™, Bio-Rad). Ces dernières ont ensuite été sélectionnées par culture en milieu LB (*Lysogeny Broth*) supplémenté en ampicilline concentrée à 50 µg/mL : les bactéries transformées sont, dans un premier temps,ensemencées sur du milieu semi-solide (peptone 10g ; extrait de levure 10g ; NaCl 5g ; agar agar 20g ; H₂O qsp 1 L ; ampicilline 50µg/mL) où elles croissent en formant des colonies ; les clones sélectionnés sont cultivés en milieu liquide dans un deuxième temps (peptone 50g ; extrait de levure 50g ; NaCl 25g ; H₂O qsp 5L ; ampicilline 50µg/mL), afin d'être amplifiés en vue d'analyses ultérieures.

Par la suite, plusieurs clones plasmidiques ont été extraits par lyse alcaline des bactéries (kit NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel) ; la présence du fragment inséré à l'étape considérée a alors été vérifiée par hydrolyse des plasmides à l'aide des enzymes *XhoI* et *PmlI* (étape 1), *EcoRI* et *XhoI* (étape 2), *KpnI* et *XhoI* (étape 3). Le profil des plasmides hydrolysés a été visualisé sur gel d'agarose (Agarose standard DNA Grade, Euromedex ; marqueur de taille : Thermo Scientific Gene Ruler DNA Ladder Mix 1kb ; tampon de charge : Blue/Orange 6X Loading Dye ; caméra UV : Kodak Gel Logic 200 Imaging System), après migration électrophorétique en tampon TAE 0,5X (Tris 20 mM ; Acétate 20 mM ; EDTA 1 mM).

Pour l'étape 3, il s'agissait également de vérifier l'orientation de l'insert : en effet, une hydrolyse par l'enzyme *EcoRI* seule expose à une introduction des fragments selon une orientation aléatoire, au sein du plasmide receveur (Figure 31).

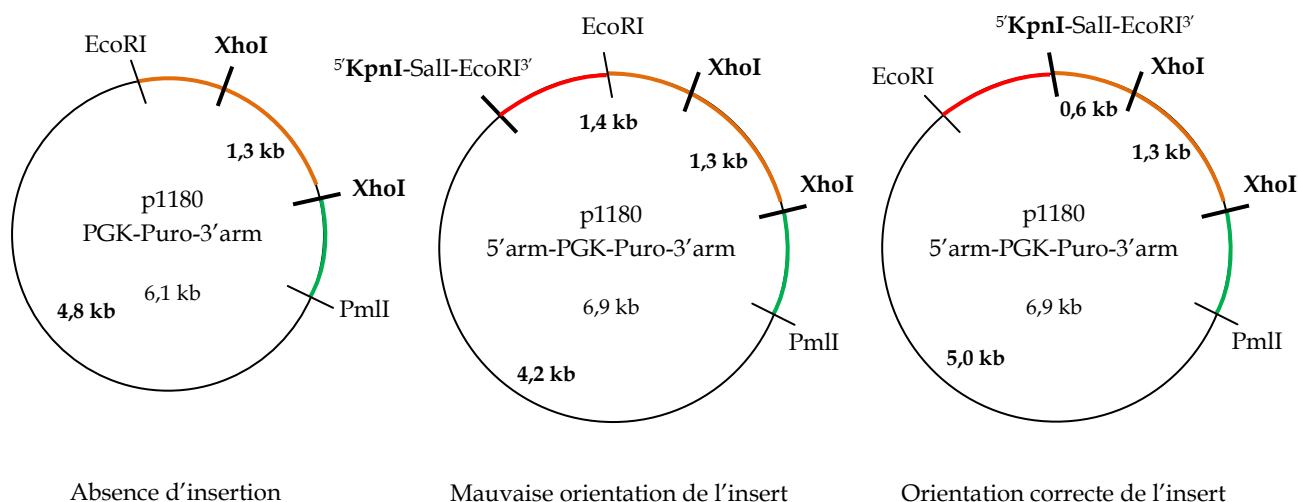


Figure 31 : Profils de restriction KpnI/XhoI du plasmide p1180 en fonction de l'insertion du fragment 5'arm homology. Le fragment 5'arm homology est représenté en rouge. En gras : sites hydrolysés à l'étape 3, et taille des fragments correspondants.

A l'issue de l'étape 4, la totalité de la structure du plasmide final p1180 5'arm-cDNA AGXT-pA BGH-PGK-Puro-3'arm a été vérifiée par hydrolyse des clones plasmidiques obtenus, à l'aide des enzymes AflII, AflII+Sall, EcoRI, KpnI+Sall et XhoI.

Les plasmides valides ont été amplifiés selon une densité plus importante que précédemment (le volume de culture des bactéries transformées est 25 fois plus grand), puis extraits des bactéries et purifiés par midi-préparation (kit NucleoBond® Xtra Midi EF, Macherey-Nagel), avant d'être quantifiés par spectrophotométrie d'absorption UV (dispositif NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) et utilisés à l'étape suivante.

I- 1.3 Préparation des plasmides pour l'étape de recombinaison homologue

Dans l'objectif d'optimiser la spécificité de recombinaison de la cassette d'expression, nous avons souhaité comparer deux stratégies de transfection cellulaire, impliquant pour l'une d'entre elles le plasmide final intègre, et pour l'autre une version linéarisée de ce plasmide.

En effet, la cassette linéarisée nécessite deux régions d'homologie avec un site génomique pour s'y intégrer par recombinaison homologue : ceci est à l'origine d'une augmentation de la fréquence d'intégration de la cassette au niveau de la cible, et d'une réduction du risque d'insertion aléatoire, qui est significatif pour la forme circulaire capable de s'intégrer sur un site ne présentant qu'une seule région homologue à une partie de sa séquence.

La linéarisation du plasmide a été réalisée par action de l'enzyme AflIII, qui présente un site de restriction unique au sein de la construction (Figure 30). L'efficacité de linéarisation a été vérifiée sur un échantillon du produit d'hydrolyse, par migration électrophorétique en gel d'agarose.

Avant de pouvoir être transfectées, les versions intègres et linéarisées du plasmide p1180 5'arm-cDNA AGXT-pA BGH-PGK-Puro-3' arm ont été filtrées à 0,22 µm, et quantifiées par spectrophotométrie d'absorption UV.

I- 2 Correction mutation-spécifique à l'aide des CRISPR/Cas9

L'objectif de cet axe du projet consiste en la correction spécifique du gène *AGXT* de fibroblastes de patients, réalisée par recombinaison homologue dirigée et adaptée à chaque type de mutation. Le clivage double-brin de la région génomique cible de recombinaison par le système CRISPR/Cas9 est destiné à favoriser la survenue des événements de recombinaison souhaités. 3 éléments sont nécessaires au développement de cette stratégie :

- un ARN guide, reconnaissant le site génomique de clivage
- une nucléase, responsable du clivage des brins d'ADN
- une matrice de recombinaison, dont une partie est introduite dans le génome à la place de la séquence mutée.

Dans le cadre du projet, l'équipe de recherche s'est orientée vers une stratégie destinée à limiter le nombre d'introductions de molécules exogènes à travers les membranes cellulaires, afin d'augmenter l'efficacité du système. Deux constructions ont donc été insérées dans chaque fibroblaste de patient : d'une part, la matrice de recombinaison, constituée d'une séquence oligodésoxyribonucléotidique simple brin d'environ 150 nucléotides ; d'autre part, un plasmide contenant la séquence de la nucléase Cas9 et les séquences protospacers spécifiques, nécessaires à la production *in situ* des ARN guides après transcription par la machinerie cellulaire.

I- 2.1 Développement du système CRISPR/Cas9

Bien que très spécifiques, les ARN guides chimériques reconnaissant les séquences cibles d'ADN peuvent tolérer jusqu'à 5 mésappariements de bases nucléotidiques (Fu *et al.*, 2013 ; Shen *et al.*, 2014), ce qui conduit à l'apparition de modifications non souhaitées de loci génomiques. Il a récemment été montré qu'il est possible d'augmenter la spécificité du clivage en remplaçant la Cas9 native par un couple de Cas9 modifiées dont un seul domaine de clivage est fonctionnel, ce qui réduit leur activité à celle de nickases, enzymes responsables de coupures simple-brins de l'ADN (Jinek *et al.*, 2012 ; Sander *et al.*, 2014). La stoechiométrie de l'association CRISPR/Cas9 étant conservée, le clivage double-brin d'un site désoxyribonucléotidique

nécessite donc l'hybridation de deux ARN guides au lieu d'un seul, sur des segments différents.

Les Cas9 utilisées dans le projet de recherche présentent la mutation D10A (D : acide aspartique ; A : alanine), qui entraîne la perte du fonctionnement du domaine RuvC (Figure 32). Leur domaine HNH demeurant le seul actif, ces nickases présentent des capacités de clivage se limitant au brin d'ADN cible s'hybridant avec la région spacer de l'ARN guide. Il faut noter qu'il existe également des Cas9 nickases mutées H840A (H : histidine) ayant perdu la fonctionnalité de leur domaine HNH, et capables de cliver uniquement le brin d'ADN antisens à celui reconnu par le spacer de l'ARN guide, grâce au domaine RuvC (Shen *et al.*, 2014).

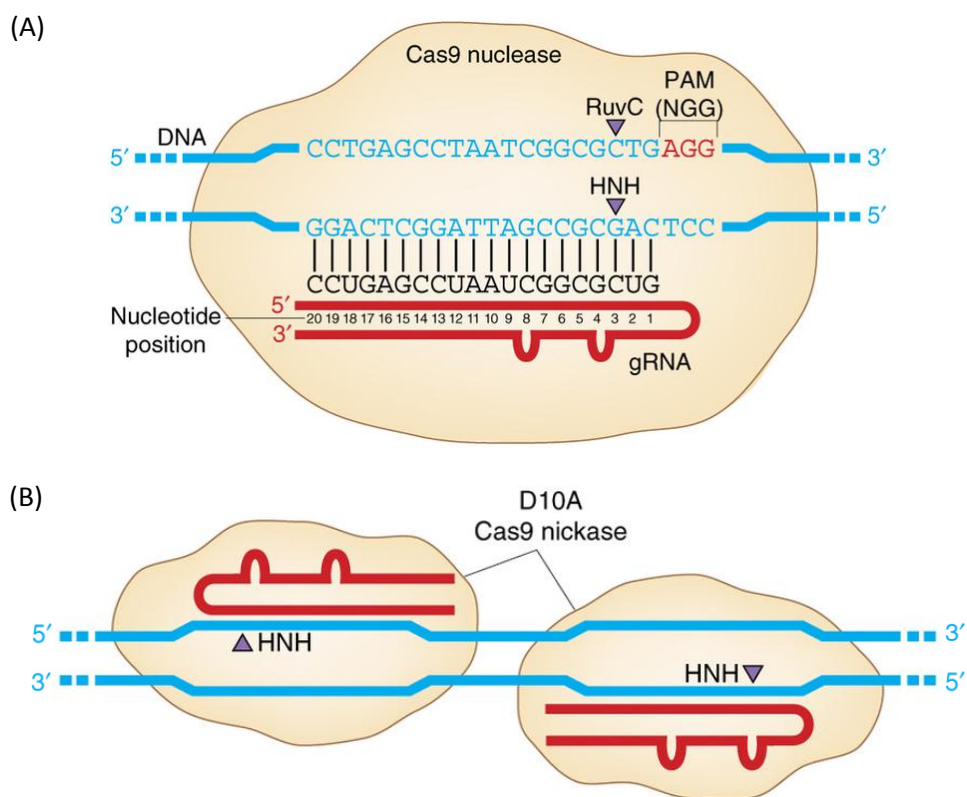


Figure 32 : Transformation des nucléases Cas9 en nickases, via la mutation D10A (Sander *et al.*, 2014). (A) Nucléase Cas9 native, capable de cliver les deux brins d'ADN grâce à ses domaines catalytiques RuvC et HNH, après reconnaissance de la cible par le spacer d'un ARN guide. (B) Le couplage de deux systèmes CRISPR/Cas9 dont les enzymes présentent la mutation D10A permet la création de coupures double-brins de l'ADN, après reconnaissance de deux sites distincts.

La stratégie précédente se caractérise par une réduction de 50 à 1 500 fois des effets hors-cibles, parallèlement au maintien d'une efficacité de clivage similaire à celle de la Cas9 native (Ran *et al.*, 2013a). De plus, la possibilité de favoriser la recombinaison homologue entre une matrice et la cible ADN clivée est conservée. L'enzyme Cas9 D10A utilisée au cours du projet est incluse dans le plasmide pX462

fourni par la société Addgene, qui correspond au plasmide vecteur de transfection du système CRISPR/Cas9 développé.

Pour chaque cible de recombinaison, il est nécessaire de mettre au point deux protospacers distincts (constitués de séquences désoxyribonucléotidiques double-brins), destinés à être introduits dans le plasmide pX462 pour contribuer, après transcription cellulaire, à l'élaboration des ARN guides spécifiques de la cible souhaitée. Dans le cadre de ce projet de recherche, l'objectif est d'obtenir la correction de 3 mutations différentes : les mutations c.508G>A et c.518G>A, situées sur l'exon 4 du gène *AGXT*, et la mutation c.731T>C, présente sur l'exon 7 ; les deux mutations présentes sur l'exon 4 étant séparées par seulement 10 pb, elles peuvent être corrigées avec le même système de recombinaison. Les cibles étant ainsi définies, le choix des séquences protospacers adéquates peut être orienté par le programme CHOPCHOP. Ce programme propose différents protospacers possibles pour chaque cible recherchée ; leur pertinence est évaluée en fonction des caractéristiques des ARN guides correspondants, des séquences cibles et de l'hybridation des ARN guides avec la cible, dans l'objectif de développer les outils présentant le meilleur accord entre efficacité de clivage élevée et minimisation des effets hors cibles (Montague *et al.*, 2014 ; Prykhodzhiy *et al.*, 2015).

Il est important de noter que le programme CHOPCHOP ne tient pas compte des modifications éventuelles des Cas9 utilisées : les protospacers sont proposés en considérant une coupure double-brin de chaque cible reconnue par le complexe CRISPR/Cas9. Il est donc nécessaire d'adapter le choix des protospacers en fonction des caractéristiques des Cas9 employées. Les sites d'hybridation des ARN guides transcrits à partir des séquences protospacers choisies sont indiqués dans la figure S3 (en annexe) ; ces séquences ont été synthétisées par la société Eurogentec.

Dans l'objectif d'insérer chaque couple de protospacer (ciblant un même exon) dans un seul plasmide, nous avons établi une stratégie en deux temps, déjà expérimentée dans le laboratoire (Figure 33).

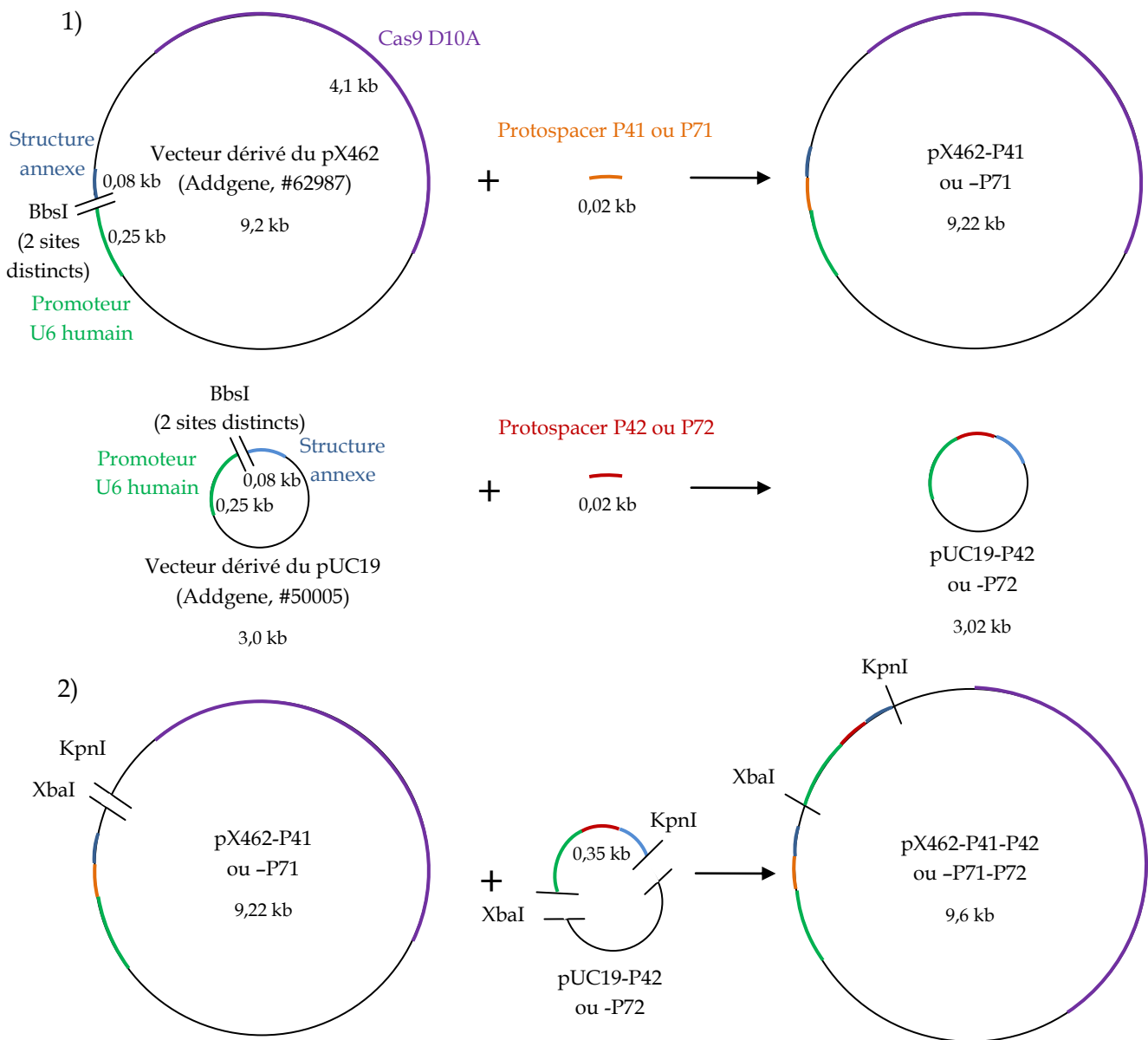


Figure 33 : Développement du plasmide d'expression des ARN guides du système CRISPR/Cas9. Les sites de restriction des enzymes employées (fournisseur BioLabs® Inc.) sont les suivants : BbsI : 5'GAAGAC(N)₂^{3'}/3'CTTCTG(N)₆^{5'}, avec N = nucléotide quelconque ; KpnI : 5'GGTAC[^]C^{3'} ; XbaI : 5'T[^]CTAGA^{3'}. Les ARN guides transcrits à partir des protospacers 41-42 et 71-72 ciblent respectivement les exons 4 et 7 du gène *AGXT*. Les protospacers présentent, à leurs extrémités, des séquences compatibles avec les extrémités cohésives issues de l'hydrolyse des plasmides par BbsI. Promoteur U6 humain : promoteur de type III de l'ARN polymérase III, contrôlant l'expression intracellulaire des protospacers. Structure annexe : séquence contribuant à la structure finale des ARN guides (composée notamment d'un équivalent du tracrRNA). La proportion entre la taille des protospacers + séquences adjacentes et celle du reste des plasmides n'est pas respectée.

Le plasmide pX462 représenté en figure 33 est également composé d'un gène de résistance bactérienne à l'ampicilline (que contient également le pUC19 ; les étapes d'amplification clonale sont identiques à celles décrites pour la construction de la

cassette de recombinaison), et d'un gène de résistance à la puromycine, permettant la sélection des cellules transfectées par le système CRISPR/Cas9.

A l'issue de la première étape de clonage, la présence des inserts dans les plasmides pUC19 et pX462 a été vérifiée par séquençage (pris en charge par la société GATC Biotech), réalisé selon la méthode de Sanger à l'aide de l'amorce suivante : 5' gactatcatatgcttaccgt 3'. L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide des programmes NCBI BLAST® (U.S. National Library of Medicine) et Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium). En revanche, l'insertion du second protospacer de chaque couple a été caractérisée dans les plasmides finaux (pX462-P41-P42 et pX462-P71-P72) par hydrolyse à l'aide des enzymes PmlI/XbaI (Figure 34).

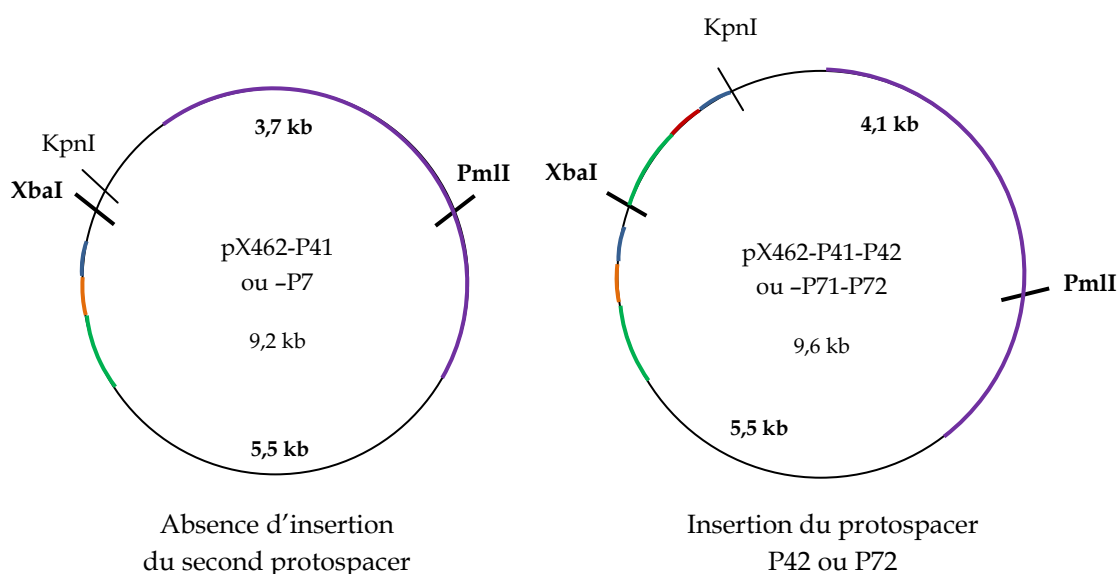


Figure 34 : Profils de restriction PmlI/XbaI du plasmide pX462 en fonction de l'insertion des protospacers P42 ou P72. En gras : sites hydrolysés et taille des fragments correspondants.

La discrimination de ces deux profils a été réalisée par migration électrophorétique de l'ADN plasmidique hydrolysé, dans un gel d'agarose 1%.

Les plasmides pX462 validés, présentant les deux protospacers de chaque couple, ont finalement été filtrés à 0,22 µm et quantifiés par spectrophotométrie d'absorption UV, afin de pouvoir être transfectés par la suite.

I- 2.2 Oligodésoxyribonucléotide de recombinaison homologue

Dans le cadre du projet de recherche, le système CRISPR/Cas9 est employé afin de corriger de façon spécifique et ponctuelle, par recombinaison homologue dirigée, des substitutions pathologiques d'une paire de base au sein du gène *AGXT* humain. Lorsque l'on souhaite générer de petites modifications de l'ADN, telles que celles envisagées, la matrice de recombinaison peut être constituée par une séquence oligodésoxyribonucléotidique simple-brin (Wang *et al.*, 2008). Il a été montré que

pour une recombinaison efficace, la matrice doit présenter une taille inférieure ou égale à 200 nucléotides, séquences homologues des extrémités comprises (Wiles *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2013). Dans notre cas, l'utilisation des couples de Cas9 nickases générant deux cassures espacées d'environ 70 nucléotides, nous avons choisi d'étendre les séquences homologues à une quarantaine de bases de part et d'autre des sites de coupure.

D'après une série d'expériences réalisées au laboratoire, il est possible d'obtenir un taux de cellules recombinées plus important lorsque l'on substitue l'un des deux acides guanyliques composant le PAM (données non publiées). Nous avons donc modifié la séquence PAM de certains protospacers, en tenant compte de la redondance du code génétique et de la fréquence d'utilisation des codons potentiels par la machinerie cellulaire humaine, associés à une volonté d'homogénéité de séquence entre les deux matrices afin d'obtenir des résultats comparables.

Les matrices oligodésoxyribonucléotidiques employées dans nos expériences ont été développées selon les caractéristiques précédemment citées, et synthétisées par la société IDT® (Figure S3, en annexe).

II- Modification du génome cellulaire par recombinaison homologue

La totalité des transfections décrites dans cette partie expérimentale a été effectuée par nucléofection, à l'aide du dispositif Nucleofector™ 2b Device (Amaxa™ ; kit V pour les cellules HepG2, kit NHDF ou *Normal Human Dermal Fibroblast* pour les fibroblastes) ; il a été montré au laboratoire que ce procédé n'est pas toxique pour les cellules considérées (données non publiées).

La culture de l'ensemble des cellules a été réalisée en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, LifeTechnologies)/sérum de veau foetal 10%/pénicilline-streptomycine 1%/ciprofloxacine 1‰, ci-après dénommé « DMEM complet ». Toutes les populations cellulaires étudiées sont adhérentes.

II- 1 Système TALENs/Cassette de recombinaison homologue

II- 1.1 Insertion d'une séquence d'ADNc AGXT humain sauvage dans des fibroblastes humains adultes

L'objectif de la transfection cellulaire étant ici double, les expériences ont été effectuées sur deux types de fibroblastes humains : d'une part, des fibroblastes sauvages issus de plastie abdominale d'un donneur sain, permettant de caractériser le

système de modification génique, et d'autre part des fibroblastes issus d'une biopsie de l'épiderme de patients homozygotes pour la mutation c.731T>C, située sur l'exon 7 du gène *AGXT* (ci-après nommés « fibroblastes PH1 »), potentiellement reprogrammables en cellules souches pluripotentes induites génétiquement corrigées.

Les conditions de transfection, déterminées à partir d'expériences précédentes réalisées au laboratoire, sont les suivantes (en quantité d'ADN plasmidique correspondant) :

- fibroblastes sauvages (500 000 cellules transfectées par condition) :
 - TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg)
 - TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg) + cassette de recombinaison linéarisée (1 ou 3 µg)
 - TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg) + cassette de recombinaison non linéarisée (3 µg)
- fibroblastes PH1 (500 000 cellules transfectées par condition)
 - TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg) + cassette de recombinaison linéarisée (1 ou 3 µg)

La condition « TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg) » constitue un témoin négatif de recombinaison, et permet l'évaluation de la cytotoxicité des cassures génomiques provoquées par les TALENs. L'introduction de deux quantités différentes de la cassette de recombinaison linéarisée permet d'évaluer l'existence d'une relation entre le nombre de copies intracellulaires de la cassette, la cytotoxicité et l'efficacité du système de recombinaison homologue. La condition « TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg) + cassette de recombinaison non linéarisée (3 µg) », supposée moins spécifique que la version linéarisée, n'a pas été réalisée sur les fibroblastes PH1.

Les conditions de culture, établies dans l'objectif d'obtenir des lignées cellulaires stables, sont schématisées ci-dessous (Figure 35) :

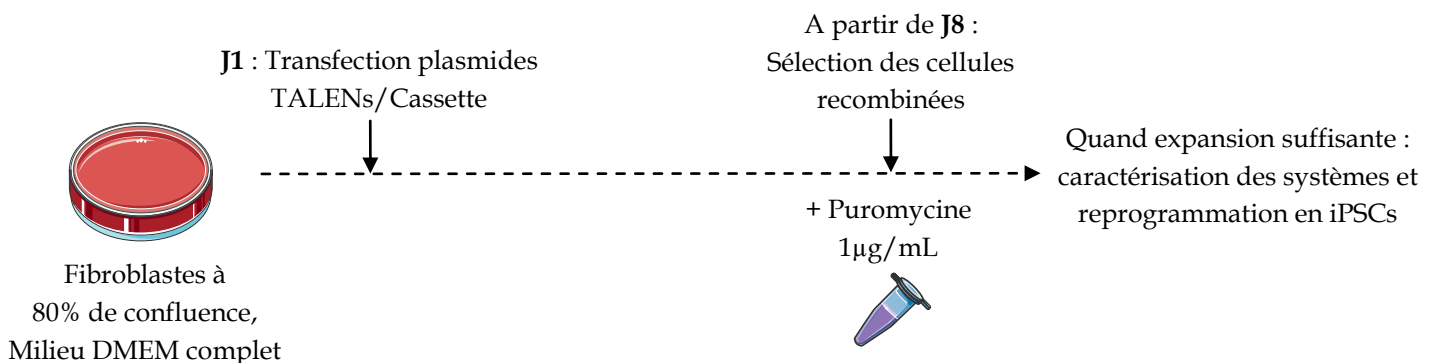


Figure 35 : Culture et sélection des fibroblastes transfectés par le système TALENs/Cassette de recombinaison homologue. L'expression du gène de résistance à la puromycine est effective dès 24h après transfection ; cependant, le délai de 8 jours choisi avant introduction de la puromycine permet

d'augmenter le taux de sélection des cellules recombinées, par rapport aux cellules non recombinées exprimant la cassette sous forme plasmidique. La concentration de puromycine est calibrée pour éliminer les cellules non transfectées par le plasmide exprimant le gène de résistance correspondant ; les cellules cultivées en présence des TALENs seules n'ont pas été traitées par la puromycine. Les cellules sont incubées à 37°C, en atmosphère à 5% CO₂ ; la culture est réalisée en boîtes de culture cellulaire de diamètre 10 cm.

II- 1.2 Expression de la cassette de recombinaison dans des cellules HepG2

Dans l'hypothèse d'une recombinaison homologue au locus ciblé, l'expression de la séquence ADNc *AGXT* contenue dans la cassette de recombinaison est sous la dépendance du promoteur physiologique du gène endogène, qui est spécifique des cellules hépatiques. Afin d'évaluer le taux d'expression cellulaire de la séquence *AGXT* exogène, nous avons donc procédé à la transfection de cellules appartenant à la lignée HepG2, issue d'un hépatocarcinome d'origine humaine, au sein desquelles le promoteur physiologique est actif.

Les conditions de culture cellulaire et de sélection sont identiques à celles des fibroblastes, tandis que les modalités de transfection sont présentées ci-après (en quantité d'ADN plasmidique correspondant ; 500 000 cellules transfectées par condition) :

- TALEN n°1 (1,5 µg) + TALEN n°2 (1,5 µg) + cassette de recombinaison linéarisée (1 ou 3 µg)
- cassette de recombinaison non linéarisée (3 µg)

La condition « cassette de recombinaison non linéarisée (3 µg) » constitue un témoin de l'intégration aléatoire de la cassette dans le génome cellulaire : en effet, la séquence ADNc *AGXT* n'étant pas sous contrôle d'un promoteur exogène, si la présence des transcrits correspondants est détectée au sein des cellules HepG2 transfectées, cela signifie que cette séquence s'est intégrée à proximité d'un promoteur endogène, au sein d'une région d'homologie. Cette condition de transfection permet également de tester l'efficacité du gène de résistance à la puromycine.

II- 2 Système CRISPR/Cas9/Matrice oligodésoxyribonucléotidique : correction génique ciblée de fibroblastes humains adultes

Les expériences ont été réalisées sur les deux types de fibroblastes mentionnés dans l'étude impliquant le système TALENs/Cassette de recombinaison homologue, à des fins identiques.

Les conditions de transfection, adaptées à partir de la littérature (Ran *et al.*, 2013b), sont les suivantes (en quantité d'ADN plasmidique correspondant) :

- fibroblastes sauvages (200 000 cellules transfectées par condition) :
 - Matrice Exon 4 ou 7 (30 pmol)
 - pX462/protospacers 41-42 (2µg)
 - pX462/protospacers 41-42 (2µg) + Matrice Exon 4 (10 ou 30 pmol)
 - pX462/protospacers 71-72 (2µg)
 - pX462/protospacers 71-72 (2µg) + Matrice Exon 7 (10 ou 30 pmol)
- fibroblastes PH1 (200 000 cellules transfectées par condition) :
 - pX462/protospacers 71-72 (2µg) + Matrice Exon 7 (10 ou 30 pmol).

Les transfections de la matrice ou du plasmide pX462 seuls constituent des témoins négatifs de recombinaison, et permettent l'analyse de la cytotoxicité de chacun de ces éléments. Le nombre inférieur de cellules transfectées par rapport aux expériences précédentes est dû à la quantité plus faible, bien que suffisante, de cellules disponibles en culture au moment prévu pour les transfections.

La sélection des cellules a été réalisée de manière transitoire, car le segment de la matrice introduit dans le génome cellulaire ne contient pas le gène de résistance à la puromycine, ce dernier étant exprimé de façon épisomique sous forme de plasmide. Les conditions de culture sont schématisées dans la figure 36.

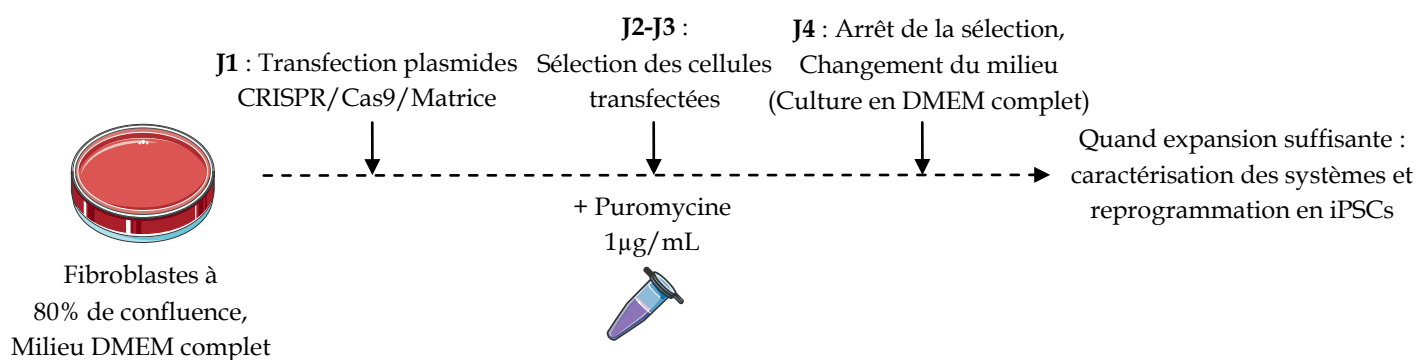


Figure 36 : Culture et sélection des fibroblastes transfectés par le système CRISPR/Cas9/Matrice oligodésoxyribonucléotidique. Après sélection, les cellules sont cultivées dans du DMEM complet jusqu'à analyse ultérieure ou reprogrammation en iPSCs. Comme précédemment, la concentration de puromycine est calibrée pour éliminer les cellules non transfectées par le plasmide exprimant le gène de résistance correspondant ; les cellules cultivées en présence des matrices oligodésoxyribonucléotidiques seules n'ont pas été traitées par la puromycine. Les cellules sont incubées à 37°C, en atmosphère à 5% CO₂ ; la culture est réalisée en boîtes de culture cellulaire de diamètre 10 cm.

Chapitre 3 : Résultats

I- Caractérisation des outils de manipulation génique

I- 1 Cassette de recombinaison homologue

Afin de vérifier la présence et l'orientation du fragment 5'arm homology inséré dans le plasmide p1180 PGK-Puro-3'arm, différents clones du plasmide p1180 5'arm-PGK-Puro-3'arm potentiellement formé ont été hydrolysés par les enzymes de restriction KpnI et XhoI. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 37).

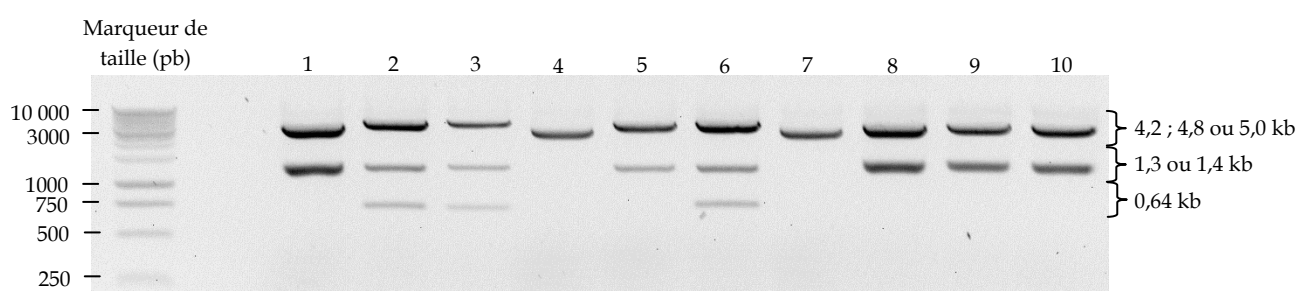


Figure 37 : Profil de restriction KpnI/XhoI du plasmide p1180 5'arm-PGK-Puro-3'arm après migration électrophorétique en gel d'agarose 1,5%. 10 clones ont été testés, numérotés de 1 à 10. Les tailles attendues pour chaque fragment, indiquées à droite de l'image, sont déduites à partir des indications fournies en figure 31.

D'après la figure 37, les clones n°2, 3 et 6 se distinguent par la présence d'une bande proche de 750 pb, pouvant être assimilée au fragment attendu de 0,64 kb (soit 640 pb) : le fragment 5'arm homology contenu dans ces clones plasmidiques est donc inséré selon l'orientation souhaitée, les clones sont considérés comme valides. En revanche, les clones n°1, 5, 8, 9 et 10 sont caractérisés par une absence d'insert ou une insertion selon la mauvaise orientation, les bandes à 1,3 kb n'étant pas discriminables de celles à 1,4 kb. Quant aux clones n°4 et 7, les bandes apparaissant sur le gel ne correspondant à aucun des fragments attendus ; ces plasmides sont donc considérés comme aberrants.

Une fois la construction de la cassette de recombinaison achevée, son agencement au sein du plasmide p1180 5'arm-cDNA AGXT-pA BGH-PGK-Puro-3'arm a été vérifié à l'aide de différentes réactions d'hydrolyses qui sont présentées, ainsi que leurs résultats, dans la figure 38.

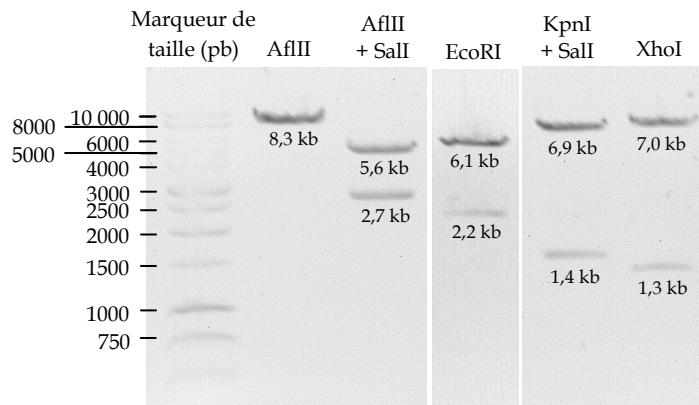


Figure 38 : Profil de restriction du plasmide p1180 5'arm-cDNA AGXT-pA BGH-PGK-Puro-3'arm selon les conditions d'hydrolyse, après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%. Les enzymes ayant clivé le plasmide sont indiquées au-dessus de chaque profil électrophorétique correspondant, tandis que les tailles attendues pour chaque fragment, déduites à partir des indications fournies en figure 30, sont indiquées en-dessous des bandes correspondantes.

D'après la figure 38, on constate que les bandes obtenues dans chaque condition sont en accord avec la représentation du plasmide indiquée en figure 30, le plasmide p1180 5'arm-cDNA AGXT-pA BGH-PGK-Puro-3'arm correspondant est donc valide. Ces résultats étant issus de deux expériences différentes, les images d'origine sont indiquées en annexe, dans la figure S4.

I- 2 Plasmides d'expression des ARN guides

Dans l'objectif de vérifier l'insertion des protospacers issus des plasmides pUC19 au sein des plasmides pX462, ces derniers ont été hydrolysés à l'aide des enzymes PmlI/XbaI. Le profil de migration des différents fragments est présenté ci-dessous (Figure 39).

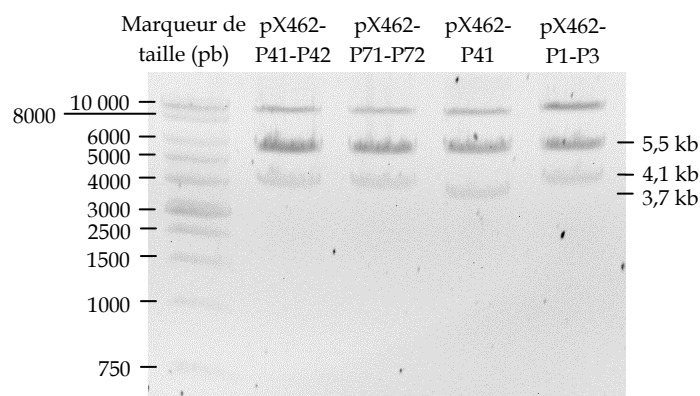


Figure 39 : Profil de restriction PmlI/XbaI du plasmide pX462 après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%. Un clone plasmidique est hydrolysé pour chacun des deux couples de protospacers développés (41-42 et 71-72) ; leur profil de restriction est comparé à celui d'un témoin négatif, représenté par le plasmide pX462 ayant intégré uniquement le protospacer 41, et à un témoin positif, correspondant

au plasmide pX462 possédant deux protospacers 1 et 3, disponible au laboratoire et développé selon la même stratégie que celle présentée. La taille des fragments attendus correspondant à chacune des bandes est indiquée à droite de l'image, d'après les informations fournies en figure 34. Les bandes apparaissant aux alentours de 10 000 pb correspondent aux plasmides non hydrolysés.

D'après la figure 39, l'hydrolyse par PmlI/XbaI des clones plasmidiques développés produit deux fragments de tailles comparables à celles des séquences issues de l'hydrolyse du témoin positif. De plus, le profil de restriction de ces clones est compatible avec la présence de deux protospacers au sein des plasmides, selon les critères établis en figure 34. Les deux clones plasmidiques testés pour les couples de protospacers 41-42 et 71-72 sont donc valides.

II- Phénotype cellulaire et toxicité

Les cellules transfectées par les deux systèmes de modification génique ciblée ont rapidement (dès J3, pour les fibroblastes) présenté des signes de toxicité, se traduisant par l'apparition de phénotypes différenciés, voire sénescents pour 10 à 20% des cellules fibroblastiques (morphologie épandue plutôt que filiforme), et par un ralentissement global de la prolifération (difficultés d'expansion et de recouvrement de la surface des boîtes de culture par les fibroblastes primaires après plus de 7 jours sans passage, contrastant avec leur rapidité native de multiplication, nécessitant un passage tous les 3 à 5 jours ; arrêt de l'expansion des HepG2 en colonies, et survie en clusters d'une dizaine de cellules). Aucune de ces manifestations n'a en revanche été observée chez les fibroblastes contrôles, cultivés en l'absence de traitement.

Le protocole de transfection ne présentant pas de toxicité inhérente, nous avons émis l'hypothèse d'une manifestation des conséquences des clivages génomiques répétés provoqués par l'action des nucléases, qui obligent les cellules à une réparation constante de leur ADN. L'action supplémentaire de la puromycine, restreignant les populations aux seules cellules exprimant le gène de résistance correspondant, semble également avoir contribué à la limitation de l'expansion cellulaire.

Malgré les effets exercés par ces différents facteurs, certaines populations cellulaires sont parvenues à proliférer. Ainsi, à J10, des niches de fibroblastes transfectés par le système CRISPR/Cas9/Matrice oligodésoxyribonucléotidique ont amorcé leur expansion, parallèlement à l'apparition de colonies résistantes de cellules HepG2 ; il est envisageable que ces cultures atteignent une densité suffisante pour permettre la qualification de l'action des systèmes de recombinaison. En revanche, la population de fibroblastes transfectés par le dispositif TALENs/Cassette de recombinaison a évolué en cellules éparses sénescents, présentant une prolifération nulle : cette population n'est pas exploitable dans ces conditions.

III- Discussion

Si les travaux réalisés au cours des derniers mois ne constituent qu'une ébauche de l'ensemble du projet de recherche, ce délai nous a permis d'achever le développement des outils de manipulation génique ciblée. Cependant, la mise en place des différents protocoles de modification du génome cellulaire à l'aide de ces outils a mené à une toxicité significative, quel que soit le type cellulaire manipulé.

L'innocuité de la technique de transfection des cellules ayant été vérifiée, deux hypothèses ont été émises pour expliquer la cause des modifications phénotypiques observées : d'une part, une dynamique de réparation constante de l'ADN cellulaire, consécutive à l'action génomique des nucléases ; d'autre part, les effets néfastes de la puromycine sur la traduction cellulaire.

Discutons dans un premier temps, le rôle potentiel de la puromycine dans la cytotoxicité constatée. Il faut tout d'abord se rappeler que les deux stratégies de sélection à l'aide de cet antibiotique sont différentes : pour l'approche de thérapie additive ciblée, le gène de résistance à la puromycine est destiné à être intégré dans le génome cellulaire en même temps que le reste de la matrice de recombinaison, ce qui permet une sélection stable des cellules, qui prolifèrent sous pression constante de l'antibiotique ; dans l'approche de correction génique ciblée en revanche, la matrice oligodésoxyribonucléotidique de recombinaison ne contient pas le gène de résistance à la puromycine, qui s'exprime de façon épisomique dans le cytoplasme cellulaire et est amené à disparaître au fur et à mesure des mitoses : les cellules sont alors sélectionnées transitoirement.

En ce qui concerne la stratégie impliquant les TALENs, seules les observations de toxicité effectuées chez les cellules HepG2, traitées par puromycine après transfection avec la cassette de recombinaison linéarisée seule, nous permettent de conclure à un effet néfaste de la puromycine malgré la présence du gène de résistance correspondant, indépendamment de la présence des nucléases. Les fibroblastes n'ayant pas été traités dans ce type de condition, aucune conclusion ne peut être formulée en l'état de nos résultats. Quant au système CRISPR/Cas9, le gène de résistance à la puromycine étant constitutif du plasmide d'expression des nucléases Cas9, il nous est impossible, dans ces conditions, de discriminer les effets toxiques potentiels des nucléases et de l'antibiotique, en présence du gène de résistance. Les fibroblastes utilisés étant des cellules primaires, globalement plus sensibles à leur environnement que les lignées cellulaires, nous pouvons cependant formuler l'hypothèse d'une toxicité de la puromycine au moins aussi importante sur les fibroblastes que sur les HepG2.

Les trois paramètres fondamentaux d'une sélection de cellules à l'aide d'un antibiotique correspondent au délai de l'introduction de la molécule de sélection par

rapport à celui de son gène de résistance (le délai doit être suffisamment important pour permettre l'expression du gène de résistance correspondant), à la durée du maintien de la pression de sélection (qui doit être suffisamment longue pour éliminer l'ensemble des cellules qui n'expriment pas le gène de résistance à la molécule employée), et à la concentration de la molécule administrée. Si le protocole que nous avons employé pour la sélection transitoire à l'aide de puromycine est cohérent avec les données de la littérature, qui sont homogènes quels que soient les types cellulaires utilisés (Li *et al.*, 2014 ; Ran *et al.*, 2013b), en revanche notre protocole de sélection stable diffère de ceux réalisés dans d'autres études d'insertion génique ciblée, qui préconisent une introduction plus précoce de la puromycine (2 à 3 jours post-transfection), à des concentrations pouvant s'étendre de 1 µg/mL à 8 µg/mL en fonction du type cellulaire utilisé (Dormiani *et al.*, 2015 ; Porteus, 2006). Dans la suite de notre étude, il nous faudra donc réaliser une série de tests, afin d'adapter les protocoles de la littérature aux types cellulaires que nous étudions.

Une autre approche d'optimisation de la sélection par puromycine a récemment été développée au laboratoire, visant à améliorer l'efficacité du gène de résistance à cet antibiotique, qui code pour une enzyme (la puromycine N-acétyltransférase) bloquant l'action de la puromycine sur la traduction. La stratégie développée consiste à modifier la séquence du gène (qui est dérivée du plasmide pX462 fourni par Addgene) afin qu'elle soit constituée, pour chaque codon, du triplet de nucléotides le plus fréquemment utilisé par la machinerie cellulaire de traduction. Cette séquence optimisée a déjà donné de bons résultats au sein du laboratoire (données non publiées), et il nous est envisageable de l'employer lors d'expériences futures.

Si malgré ces modifications, la toxicité cellulaire persiste, une sélection alternative par cytométrie en flux est possible, en considérant le remplacement du gène de résistance à la puromycine par un gène codant pour une protéine fluorescente, telle que la GFP. Cette méthode a déjà permis un tri efficace de cellules souches embryonnaires murines transfectées par le système CRISPR/Cas9, dans le cadre d'une étude de correction génique ciblée à l'aide de matrices oligodésoxyribonucléotidiques (Li *et al.*, 2014). Cette technique est significativement moins toxique que la sélection par puromycine ; cependant, elle implique une manipulation plus lourde des cellules, potentiellement source de contamination.

Intéressons-nous à présent aux effets des outils de manipulation génique ciblée. En théorie, le clivage génomique réalisé par les nucléases présente deux grandes conséquences toxiques pour la cellule : d'une part, elle oblige la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN génomique, ce qui bloque temporairement le cycle cellulaire et ralentit la prolifération ; d'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, la fidélité des mécanismes qui interviennent dans le

processus de réparation n'est pas totale (notamment en ce qui concerne la voie de NHEJ), ce qui peut être à l'origine de mutations génomiques parfois létales pour la cellule.

En ce qui concerne notre étude, la toxicité observée chez les fibroblastes traités par les TALENs seules, non sélectionnées par la puromycine, nous permet de conclure à un impact de ces outils sur le fonctionnement des cellules fibroblastiques primaires, ce qui est en corrélation avec les analyses préliminaires ayant permis de vérifier *in vitro* leur efficacité de clivage génomique. Des expériences complémentaires doivent être entreprises pour permettre d'établir si, outre la génération d'une toxicité, les clivages réalisés par les TALENs ont favorisé l'apparition d'événements de recombinaison homologue ciblée.

Quant au système CRISPR/Cas9, aucune des conditions de culture mises en place ne permet d'évaluer distinctement le rôle des nucléases Cas9 dans la cytotoxicité, en l'état de nos résultats. De plus, contrairement aux TALENs, nous n'avons pas encore procédé à une analyse de l'efficacité de clivage de ce système ; la priorité sera donnée à la résolution de cette question dans la poursuite du projet, avant d'envisager des analyses approfondies de la spécificité de clivage par les Cas9, de la capacité du système à faciliter la recombinaison homologue ciblée, et de la toxicité inhérente.

Si la priorité consiste à vérifier expérimentalement la présence de signatures génomiques de l'action des nucléases avant d'entreprendre une optimisation des protocoles de transfection, nous pouvons cependant envisager différentes manipulations destinées à améliorer l'efficacité et réduire la toxicité des systèmes de recombinaison développés. L'objectif de ces modifications consiste à augmenter la spécificité du clivage, ce qui favorise la survenue d'événements de recombinaison au sein des régions cibles, et diminue les effets hors-cibles qui entraînent une multiplication des sites de cassure, réparés par le système non fidèle NHEJ.

Pour les TALENs, il est ainsi possible de réduire l'intervention du NHEJ et de favoriser le HDR en utilisant des TALE *nickases*, dont l'un des monomères FokI du couple présente la mutation D450A, qui abolit l'activité catalytique de l'enzyme sans affecter la dimérisation protéique des TALE ou la reconnaissance de l'ADN cible (Sanders *et al.*, 2009). L'emploi de ce type de construction a permis à l'équipe de Wu d'introduire le gène murin *SP110* (médiateur de l'immunité dirigée contre *Mycobacterium tuberculosis*) au sein du génome de fibroblastes fœtaux bovins par recombinaison homologue, et de créer des animaux transgéniques présentant une résistance plus importante à la tuberculose bovine (Wu *et al.*, 2015). Une seconde modification envisageable pour optimiser le clivage ciblé par les TALENs correspond à l'emploi d'hétérodimères obligatoires : plusieurs séries de mutations (E490K, I538K et H537R ou « KKR » d'une part et Q486E, I499L et N496D ou « ELD » d'autre part ; avec D : acide aspartique, E : acide glutamique, H : histidine, I : isoleucine, K : lysine,

L : leucine, N : asparagine, Q : glutamine et R : arginine) ont été appliquées aux monomères de l'endonuclease de restriction FokI afin de polariser la dimérisation (le monomère « KKR » présente une charge globalement positive au niveau du site de dimérisation, et le monomère « ELD » présente une charge négative) (Doyon *et al.*, 2011 ; Miller *et al.*, 2007). L'emploi de ces monomères modifiés permet d'augmenter l'activité et la spécificité des TALENs en réduisant leur toxicité, comme cela a été montré lors d'une étude de mutation génique ciblée (« *knocking out* ») chez le poisson-zèbre (Cade *et al.*, 2012).

Quant au système CRISPR/Cas9, le protocole que nous avons établi emploie des Cas9 nickases, ce qui rend optimale l'activité catalytique de ces enzymes en termes de spécificité et d'efficacité. Cependant, dans l'objectif de réduire le temps de demi-vie des Cas9 et diminuer le risque de clivages multiples du site cible après recombinaison, il est possible d'employer des séquences d'ARNm plutôt que des plasmides codant pour les nickases (Shen *et al.*, 2014) ; cette méthode est également applicable aux TALENs (Cade *et al.*, 2012). Des modifications peuvent également être envisagées envers la structure des ARN guides. Il a en effet été montré que l'utilisation de « *dualRNAs* » qui correspondent à l'addition d'un crRNA et d'un tracrRNA (dont les séquences sont ainsi plus fidèles aux composés naturels que les ARN guides), présentant deux acides guanyliques additionnels en 5' de la région complémentaire à l'ADN cible (qui assurent une expression optimale du promoteur U6) et codés par des oligonucléotides synthétiques (plutôt que des plasmides), autorise une discrimination des sites cibles et non-cibles si leur séquence diffère d'au moins deux nucléotides (ce qui contraste avec les 5 mésappariements tolérés par les ARN guides, comme nous l'avons vu précédemment) (Cho *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2014).

Plusieurs axes de modifications sont donc envisageables pour optimiser nos systèmes, d'après les dysfonctionnements identifiés, et obtenir le meilleur compromis entre toxicité des nucléases et efficacité de la correction ciblée.

Conclusion et perspectives

L'observation phénotypique des cellules permet d'envisager une action intracellulaire des systèmes transfectés. Cependant, une analyse approfondie de la toxicité des systèmes doit être entreprise, parallèlement à la réalisation d'expériences destinées à affirmer l'existence réelle de cassures génomiques, et mettre en évidence l'apparition d'événements de recombinaison homologue dirigée.

En ce qui concerne l'évaluation et le contrôle de la cytotoxicité, après avoir analysé plus précisément l'implication de la puromycine dans la toxicité phénotypique des fibroblastes, il sera intéressant de mettre en place les protocoles de sélection par cet antibiotique préconisés dans la littérature, afin de comparer les résultats obtenus à ceux de nos expériences précédentes. Dans un deuxième temps, il sera envisageable si nécessaire de modifier la structure de nos constructions, en remplaçant le gène de résistance à la puromycine par sa version optimisée dans les deux stratégies, et en modifiant la cinétique de l'expression de ce gène et de celle de la Cas9 par création de deux plasmides distincts, pour la stratégie de correction génique ciblée.

Quant aux systèmes de recombinaison homologue ciblée, la priorité consiste en une évaluation de l'efficacité du clivage orienté par les ARN guides, afin de s'assurer de la capacité du système CRISPR/Cas9 à générer des cassures double-brins. Nous pourrions également procéder à l'analyse du taux de recombinaison homologue propre à chaque population de fibroblastes transfectés, après amplification par PCR des régions génomiques cibles de recombinaison : pour la stratégie de correction génique ciblée, le taux de recombinaison sera corrélé à la proportion de fragments hydrolysés par les enzymes dont le site de restriction figure au sein de la matrice oligodésoxyribonucléotidique ; pour la méthode de thérapie additive ciblée, les expériences d'amplification seront réalisées à l'aide d'amorces spécifiques s'hybridant de part et d'autre des jonctions cassette/locus cible endogène.

L'objectif final du projet consistant en la synthèse de la protéine AGT native dans des cellules hépatiques autologues, il sera également nécessaire de vérifier le taux d'expression de la séquence d'ADNc AGXT comprise dans la cassette de recombinaison. Des expériences de PCR quantitative en temps réel sont ainsi envisagées dans les cellules HepG2 transfectées par le système TALENs/Cassette de recombinaison.

L'évaluation de l'ensemble des paramètres précédemment cités est nécessaire au développement d'un produit sécurisé et susceptible de présenter un impact positif sur le phénotype des patients. De plus, la poursuite du projet de recherche implique l'existence d'un taux de recombinaison suffisamment important (estimé empiriquement à plus de 20% de cellules corrigées au sein d'une même population) pour être compatible avec la sélection clonale des iPSCs dérivées de fibroblastes, avant l'étape finale de différenciation hépatocytaire.

Bibliographie

Alba R, Bosch A, and Chillon M; **Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy.**; *Gene Ther.*; 2005; Vol. 12; Suppl 1; p18-27

Aleman R, Dai Y, Lou YC, Sethi E, Prokopenko E, Josephs SF, and Zhang WW; **Complementation of helper-dependent adenoviral vectors: size effects and titer fluctuations.**; *J Virol Methods.*; 1997; Vol. 68; p147-159

Alton EW, Boyd AC, Cheng SH, Cunningham S, Davies JC, Gill DR, Griesenbach U, Higgins T, Hyde SC, Innes JA, Murray GD, and Porteous DJ; **A randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIB clinical trial of repeated application of gene therapy in patients with cystic fibrosis.**; *Thorax.*; 2013; Vol. 68; p1075-1077

Alvarez RD, Sill MW, Davidson SA, Muller CY, Bender DP, DeBernardo RL, Behbakht K, and Huh WK; **A phase II trial of intraperitoneal EGEN-001, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: a gynecologic oncology group study.**; *Gynecol Oncol.*; 2014; Vol. 133; p433-438

Amalfitano A, Hauser MA, Hu H, Serra D, Begy CR, and Chamberlain JS; **Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted.**; *J Virol.*; 1998; Vol. 72; p926-933

Anders C, Niewoehner O, Duerst A, and Jinek M; **Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease.**; *Nature.*; 2014; Vol. 513; p569-573

Armentano D, Zabner J, Sacks C, Sookdeo CC, Smith MP, St George JA, Wadsworth SC, Smith AE, and Gregory RJ; **Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors.**; *J Virol.*; 1997; Vol. 71; p2408-2416

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, and Lovell-Badge R; **Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function.**; *Genes Dev.*; 2003; Vol. 17; p126-140

Bellon G, Michel-Calemard L, Thouvenot D, Jagneaux V, Poitevin F, Malcus C, Accart N, Layani MP, Aymard M, Bernon H, Bienvenu J, Courtney M, Döring G, Gilly B, Gilly R, Lamy D, Levrey H, Morel Y, Paulin C, Perraud F, Rodillon L, Sené C, So S, Touraine-Moulin F, Pavirani A, et al.; **Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial.**; *Hum Gene Ther.*; 1997; Vol. 8; p15-25

Bergstralh EJ, Monico CG, Lieske JC, Herges RM, Langman CB, Hoppe B, and Milliner DS; IPHR Investigators; **Transplantation outcomes in primary hyperoxaluria.**; *Am J Transplant.*; 2010; Vol. 10; p2493-2501

Bett AJ, Prevec L, and Graham FL; **Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors.**; *J Virol.*; 1993; Vol. 67; p5911-5921

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, and Anderson WF; **T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years.**; *Science.*; 1995; Vol. 270; p475-480

Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, and Bonas U; **Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors**; *Science.*; 2009; Vol. 326; p1509-1512

Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Díez IA, Dewey RA, Böhm M, Nowrouzi A, Ball CR, Glimm H, Naundorf S, Köhlcke K, Blasczyk R, Kondratenko I, Maródi L, Orange JS, von Kalle C, and Klein C; **Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome.**; *N Engl J Med.*; 2010; Vol. 363; p1918-1927

Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joung JK, Sander JD, Peterson RT, and Yeh JR; **Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs.**; *Nucleic Acids Res.*; 2012; Vol. 40; p8001-8010

Cao F, Xie X, Gollan T, Zhao L, Narsinh K, Lee RJ, and Wu JC; **Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells.**; *Mol Imaging Biol.*; 2010; Vol. 12; p15-24

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, and Aubourg P; **Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy.**; *Science.*; 2009; Vol. 326; p818-823

Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, and Dalton S; **LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism**; *Development*; 2005; Vol. 132; p885-896

Cavazzana-Calvo M, and Fischer A; **Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?**; *J Clin Invest.*; 2007; Vol. 117; p1456-1465

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, and Fischer A.; **Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.**; *Science.*; 2000; Vol. 288; p669-672

Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, and Voytas DF; **Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting.**; *Nucleic Acids Res.*; 2011; Vol 39

Chauhan DP, Srivastava AS, Moustafa ME, Shenouda S, and Carrier E; **In utero gene therapy: prospect and future.**; *Curr Pharm Des.*; 2004; Vol. 10; p3663-3672

Chen S, Chen J, Xi W, Xu W, and Yin G; **Clinical therapeutic effect and biological monitoring of p53 gene in advanced hepatocellular carcinoma.**; *Am J Clin Oncol.*; 2014; Vol. 37; p24-29

Chevalier BS, Kortemme T, Chadsey MS, Baker D, Monnat RJ, and Stoddard BL; **Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease.**; *Mol Cell.*; 2002; Vol. 10; p895-905

Chiozzini C, and Toschi E; **HIV-1 TAT and IMMUNE DYSREGULATION in AIDS PATHOGENESIS: a THERAPEUTIC TARGET.**; *Curr Drug Targets.*; 2015

Chiu SJ, Ueno NT, and Lee RJ; **Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine.**; *J Control Release.*; 2004; Vol. 97; p357-369

Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, and Kim JS; **Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases.**; *Genome Res.*; 2014; Vol. 24; p132-141

Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, Abbs S, Garralda ME, Bourke J, Wells DJ, Dickson G, Wood MJ, Wilton SD, Straub V, Kole R, Shrewsbury SB, Sewry C, Morgan JE, Bushby K, and Muntoni F; **Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study.**; *Lancet.*; 2011; Vol. 378; p595-605

Ciuffi A, Diamond TL, Hwang Y, Marshall HM, and Bushman FD; **Modulating target site selection during human immunodeficiency virus DNA integration in vitro with an engineered tethering factor.**; *Hum Gene Ther.*; 2006; Vol. 17; p960-967

Cochat P, Fargue S, and Harambat J; **Primary hyperoxaluria type 1: strategy for organ transplantation.**; *Curr Opin Organ Transplant.*; 2010a; Vol. 15; p590-593

Cochat P, Pichault V, Bacchetta J, Dubourg L, Sabot JF, Saban C, Daudon M, and Liutkus A; **Nephrolithiasis related to inborn metabolic diseases.**; *Pediatr Nephrol.*; 2010b; Vol. 25; p415-424

Coci EG, Maetzig T, Zychlinski D, Rothe M, Suerth JD, Klein C, and Schambach A; **Novel self-inactivating vectors for reconstitution of Wiskott-Aldrich syndrome.**; *Curr Gene Ther.*; 2015; Vol. 15; p245-254

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, and Zhang F; **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.**; *Science.*; 2013; Vol. 339; p819-823

Collins DR, Lubow J, Lukic Z, Mashiba M, and Collins KL; **Vpr Promotes Macrophage-Dependent HIV-1 Infection of CD4+ T Lymphocytes.**; *PLoS Pathog.*; 2015; Vol. 11

Connelly JP, Barker JC, Pruett-Miller S, and Porteus MH; **Gene Correction by Homologous Recombination With Zinc Finger Nucleases in Primary Cells From a Mouse Model of a Generic Recessive Genetic Disease.**; *Mol Ther.*; 2010; Vol. 18; p1103-1110

Corcos L, and Solier S ; **Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire.**; *Med Sci (Paris).*; 2005; Vol. 21; p253-260.

Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT, and Danel C.; **Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis.**; *Nat Genet.*; 1994; Vol. 8; p42-51

Danpure CJ; Primary hyperoxaluria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, and Vogelstein B (Eds); **The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease** (8th edition); New York, McGraw-Hill; 2001; p3323-3367

Danthinne X, and Imperiale MJ; **Production of first generation adenovirus vectors: a review.**; *Gene Ther.*; 2000; Vol. 7; p1707-1714

Davis AJ, and Chen DJ; **DNA double strand break repair via non-homologous end-joining.**; *Transl Cancer Res.*; 2013; Vol. 2; p130-143

Daya S, and Berns KI; **Gene therapy using adeno-associated virus vectors.**; *Clin Microbiol Rev.*; 2008; Vol. 21; p583-593

Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, and Smithies O; **Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells.**; *Nature.*; 1987; Vol. 330; p576-578

Donoho G, Jasin M, and Berg P; **Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells.**; *Mol Cell Biol.*; 1998; Vol. 18; p4070-4078

Dormiani K, Mir Mohammad Sadeghi H, Sadeghi-Aliabadi H, Ghaedi K, Forouzanfar M, Baharvand H, and Nasr-Esfahani MH; **Long-term and efficient expression of human β -globin gene in a hematopoietic cell line using a new site-specific integrating non-viral system.**; *Gene Ther.*; 2015; Vol. 22; p663-674

Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, and Holmes MC.; **Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures.**; *Nat Methods.*; 2011; Vol. 8; p74-79

Dufait I, Liechtenstein T, Lanna A, Laranga R, Padella A, Bricogne C, Arce F, Kochan G, Breckpot K and Escors D; **Lentiviral Vectors in Immunotherapy.** In : Gene Therapy - Tools and Potential Applications; Francisco Martin Molina; 2013; p319-341

Dunckley MG, Manoharan M, Villiet P, Eperon IC, and Dickson G; **Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides.**; *Hum Mol Genet.*; 1998; Vol. 7; p1083-1090

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, and Tuschl T; **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.**; *Nature.*; 2001a; Vol. 411; p494-498

Elbashir SM, Lendeckel W, and Tuschl T; **RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.**; *Genes Dev.*; 2001b; Vol. 15; p188-200

Evans MJ, and Kaufman MH; **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.**; *Nature.*; 1981; Vol. 292; p154-156

Fan Z, Li W, Lee SR, Meng Q, Shi B, Bunch TD, White KL, Kong IK, and Wang Z; **Efficient gene targeting in golden Syrian hamsters by the CRISPR/Cas9 system.**; *PLoS One.*; 2014; Vol. 9

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, and Danielsen M; **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 1987; Vol. 84; p7413-7417

Fineran PC, and Charpentier E; **Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information.**; 2012; *Virology*.; Vol. 434; p202-209

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC; **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.**; *Nature*.; 1998; Vol. 391; p806-811

Fischer A, de Saint Basile G, Hacein-Bey S, Soudais C, Di Santo J, and Cavazzana-Calvo M; **Thérapie génique des déficits immunitaires : approche expérimentale et premiers résultats cliniques.**; *Med Sci (Paris)*; 1999; Vol. 15; p606-614

Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, and Cavazzana-Calvo M; **Thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l’X : Efficacité et complications.**; *Med Sci (Paris)*.; 2004; Vol. 20; p115-117

Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, and Sander JD; **High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells**; *Nat Biotechnol*.; 2013; Vol. 31; p822-826

Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, and Joung JK; **Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs.**; *Nat Biotechnol*.; 2014; Vol. 32; p279-284

Fujita S, Eguchi A, Okabe J, Harada A, Sasaki K, Ogiwara N, Inoue Y, Ito T, Matsuda H, Kataoka K, Kato A, Hasegawa M, and Nakanishi M; **Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion**; *Biol Pharm Bull*.; 2006; Vol. 29; p1728-1734

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, and Qi LS; **CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.**; *Cell*.; 2013; Vol. 154 ; p442-451

Gros F; **La génomique et ses applications : promesses et limites**; *C R Biol*.; 2015; Vol. 338; p543-546

Guha C, Yamanouchi K, Jiang J, Wang X, Roy Chowdhury N, Santana A, Shapiro LJ, Salido E, and Roy-Chowdhury J ; **Feasibility of hepatocyte transplantation-based therapies for primary hyperoxalurias.**; *Am J Nephrol*.; 2005; Vol. 25; p161-170

Haas M, Vlcek V, Balabanov P, Salmonson T, Bakchine S, Markey G, Weise M, Schlosser-Weber G, Brohmann H, Yerro CP, Mendizabal MR, Stoyanova-Beninska V, and Hillege HL; **European Medicines Agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene.**; *Neuromuscul Disord*.; 2015; Vol. 25; p5-13

Haddley K; **Alipogene tiparvovec for the treatment of lipoprotein lipase deficiency.**; *Drugs Today (Barc)*.; 2013; Vol. 49; p161-170

Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, and Nelson KE; **A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes**; *PLoS Comput Biol*.; 2005; Vol. 1

He X, Liao J, Liu F, Yan J, Yan J, Shang H, Dou Q, Chang Y, Lin J, and Song Y; **Functional repair of p53 mutation in colorectal cancer cells using trans-splicing.**; *Oncotarget*.; 2015a; Vol. 6; p2034-2045

He X, Liu F, Yan J, Zhang Y, Yan J, Shang H, Dou Q, Zhao Q, and Song Y; **Trans-splicing repair of mutant p53 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo.**; *Sci Rep.*; 2015b; Vol. 5

Helleday T, Lo J, van Gent DC, and Engelward BP; **DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment.**; *DNA Repair (Amst).*; 2007; Vol. 6; p923-935

Henning KA, Novotny EA, Compton ST, Guan XY, Liu PP, and Ashlock MA; **Human artificial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 1999; Vol. 96; p592-597

Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, and Gersbach CA; **Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers.**; *Nat Biotechnol.*; 2015; Vol. 33; p510-517

Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, and Jaenisch R; **Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases**; *Nat Biotechnol.*; 2011; Vol. 29; p731-734

Hollinger K, and Chamberlain JS; **Viral vector-mediated gene therapies.**; *Curr Opin Neurol.*; 2015

Hoppe B, Beck BB, and Milliner DS; **The primary hyperoxalurias**; *Kidney Int.*; 2009; Vol. 75; p1264-1271

Horvath P, and Barrangou R; **CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.**; *Science.*; 2010; Vol. 327; p167-170

Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, and Deng H; **Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds**; *Science.*; 2013; Vol. 341; p651-654

Huraux JM; **Traité de virologie médicale**; De Boeck Secundair; 2003; 712p.

Jia J, Bai F, Jin Y, Santostefano KE, Ha UH, Wu D, Wu W, Terada N, and Jin S; **Efficient Gene Editing in Pluripotent Stem Cells by Bacterial Injection of Transcription Activator-Like Effector Nuclease Proteins.**; *Stem Cells Transl Med.*; 2015; Vol. 4; p913-926

Jiang J, Salido EC, Guha C, Wang X, Moitra R, Liu L, Roy-Chowdhury J, and Roy-Chowdhury N; **Correction of hyperoxaluria by liver repopulation with hepatocytes in a mouse model of primary hyperoxaluria type-1.**; *Transplantation.*; 2008; Vol. 85; p1253-1260

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, and Charpentier E; **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**; *Science*; 2012; Vol. 337; p816-821

Jinkerson RE, and Jonikas MC; **Molecular techniques to interrogate and edit the Chlamydomonas nuclear genome.**; *Plant J.*; 2015; Vol. 82; p393-412

Jones CH, Hill A, Chen M, and Pfeifer BA; **Contemporary approaches for nonviral gene therapy.**; *Discov Med.*; 2015; Vol. 19; p447-454

- Katz RA, Merkel G, and Skalka AM; **Targeting of retroviral integrase by fusion to a heterologous DNA binding domain: in vitro activities and incorporation of a fusion protein into viral particles.**; *Virology.*; 1996; Vol. 217; p178-190
- Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, and Eto Y; **Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp)**; *Mol Genet Metab.*; 2013; Vol. 109; p386-389
- Kazuki Y, and Oshimura M; **Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models.**; *Mol Ther.*; 2011; Vol. 19; p1591-1601
- Kim H, and Kim JS; **A guide to genome engineering with programmable nucleases.**; *Nat Rev Genet.*; 2014; Vol. 15; p321-334
- Kim TH, Park IK, Nah JW, Choi YJ, and Cho CS; **Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier.**; *Biomaterials.*; 2004; Vol. 25; p3783-3792
- Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, and Wilson JM; **Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo.**; *Nat Biotechnol.*; 2001; Vol. 19; p225-230
- Konvalinka J, Kräusslich HG, Müller B; **Retroviral proteases and their roles in virion maturation.**; *Virology.*; 2015; Vol. 479-480; p403-417
- Koontz L; **Explanatory chapter: introducing exogenous DNA into cells.**; *Methods Enzymol.*; 2013; Vol. 529; p29-34
- Kotnik T, Frey W, Sack M, Haberl Meglič S, Peterka M, and Miklavčič D; **Electroporation-based applications in biotechnology.**; *Trends Biotechnol.*; 2015; Vol. 33; p480-488
- Kotterman MA, and Schaffer DV; **Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy.**; *Nat Rev Genet.*; 2014 ; Vol. 15; p445-451
- Kouprina N, Earnshaw WC, Masumoto H, and Larionov V; **A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy.**; *Cell Mol Life Sci.*; 2013; Vol. 70; p1135-1148
- Lamb RA, and Kolakofsky D; **Fundamental Virology, Fourth Edition**; ed. by Knipe DM, and Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.; 2001; p689-724
- Laner A, Goussard S, Ramalho AS, Schwarz T, Amaral MD, Courvalin P, Schindelhauer D, and Grillot-Courvalin C; **Bacterial transfer of large functional genomic DNA into human cells.**; *Gene Ther.*; 2005; Vol. 12; p1559-1572
- Larson JE, and Cohen JC.; **In utero gene therapy.**; *Ochsner J.*; 2000; Vol. 2; p107-110
- Larson JE, Morrow SL, Happel L, Sharp JF, and Cohen JC; **Reversal of cystic fibrosis phenotype in mice by gene therapy in utero**; *Lancet.*; 1997; Vol. 349; p619-620.

Lemarchandel V, and Montagutelli X; **La recombinaison homologue : De nouvelles perspectives pour la transgénèse chez les mammifères**; *Med Sci.*; 1990 ; Vol. 6 ; p18-29

Lesnik EA, Sampath R, and Ecker DJ; **Rev response elements (RRE) in lentiviruses: an RNAMotif algorithm-based strategy for RRE prediction.**; *Med Res Rev.*; 2002; Vol. 22; p617-636

Levy JA; **The Retroviridae**; Springer Science & Business Media; 2013; 455p.

Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, and Hasegawa M; **A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression**; *J Virol.*; 2000; Vol. 74; p6564-6569

Li K, Wang G, Andersen T, Zhou P, and Pu WT; **Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system.**; *PLoS One.*; 2014; Vol.9

Li L, He ZY, Wei XW, Gao GP, Wei YQ; **Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors.**; *Hum Gene Ther.*; 2015; Vol. 26; 452-462

Li W, Teng F, Li T, and Zhou Q; **Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems.**; *Nat Biotechnol.*; 2013; Vol. 31; p684-686

Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, and Chan RJ; **Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4**; *Blood*; 2005; Vol. 105; p635-637

Lodish HF, Zhou B, Liu G, and Chen CZ; **Micromanagement of the immune system by microRNAs.**; *Nat Rev Immunol.*; 2008; Vol. 8; p120-130

Lu B, Xu XD, Zhang XZ, Cheng SX, and Zhuo RX; **Low molecular weight polyethylenimine grafted N-maleated chitosan for gene delivery: properties and in vitro transfection studies.**; *Biomacromolecules.*; 2008; Vol. 9; p2594-2600

Ma N, Liao B, Zhang H, Wang L, Shan Y, Xue Y, Huang K, Chen S, Zhou X, Chen Y, Pei D, and Pan G; **Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free β -thalassemia induced pluripotent stem cells.**; *J Biol Chem.*; 2013; Vol. 288; p34671-34679

Mack AA, Kroboth S, Rajesh D, and Wang WB; **Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from CD34+ Cells across Blood Drawn from Multiple Donors with Non-Integrating Episomal Vectors**; *PLoS One.*; 2011; Vol. 6

Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zeleniaia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, and Bennett J; **Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial.**; *Lancet.*; 2009; Vol. 374; p1597-1605

Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, Vrbanc V, Garrison BS, Stortchevoi A, Bryder D, Musunuru K, Brand H, Tager AM, Allen TM, Talkowski ME, Rossi DJ, and Cowan CA; **Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9.**; *Cell Stem Cell.*; 2014; Vol. 15; p643-652

Martin GR; **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1981; Vol. 78; p7634-7638

Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, and Serikawa T; **Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases.**; *PLoS One.*; 2010; Vol. 5

Mehta A, and Haber JE; **Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair.**; *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 2014; Vol. 6

Meyer K, Marquis J, Trüb J, Nlend Nlend R, Verp S, Ruepp MD, Imboden H, Barde I, Trono D, and Schümperli D; **Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation.**; *Hum Mol Genet.*; 2009; Vol. 18; p546-555

Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, and Rebar EJ; **An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing.**; *Nat Biotechnol.*; 2007; Vol. 25; 778-785

Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, and Rebar EJ; **A TALE nuclease architecture for efficient genome editing**; *Nat Biotechnol.*; 2011; Vol. 29; p143-148

Mlcochova P, Apolonia L, Kluge SF, Sridharan A, Kirchhoff F, Malim MH, Sauter D, and Gupta RK; **Immune evasion activities of accessory proteins Vpu, Nef and Vif are conserved in acute and chronic HIV-1 infection.**; *Virology.*; 2015; Vol. 482; p72-78

Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, and Valen E; **CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing**; *Nucleic Acids Res.*; 2014; Vol. 42

Montioli R, Fargue S, Lewin J, Zamparelli C, Danpure CJ, Borri Voltattorni C, and Cellini B; **The N-terminal extension is essential for the formation of the active dimeric structure of liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase**; *Int J Biochem Cell Biol.* ; 2012; Vol. 44; p536-546

Morishita R; **New era in gene therapy: end of the beginning.**; *Expert Opin Biol Ther.*; 2015; Vol. 15; p309-310

Mostaghaci B, Susewind J, Kickelbick G, Lehr CM, and Loretz B; **Transfection system of amino-functionalized calcium phosphate nanoparticles: in vitro efficacy, biodegradability, and immunogenicity study.**; *ACS Appl Mater Interfaces.*; 2015; Vol. 7; p5124-5133

Murphy WJ, Watkins KP, and Agabian N; **Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing.**; *Cell.*; 1986; Vol. 47; p517-525

Mussolino C, Mlambo T, Cathomen T; **Proven and novel strategies for efficient editing of the human genome.**; *Curr Opin Pharmacol.*; 2015; Vol. 24; p105-112

Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, and Cathomen T; **A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity**; *Nucleic Acids Res*; 2011; Vol. 39; p9283-9293

Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N, and Yamamoto T; **Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes.**; *BMC Biotechnol.*; 2015; Vol. 15

Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, and Trono D; **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.**; *Science.*; 1996; Vol. 272; p263-267

Negishi Y, Ishii Y, Shiono H, Akiyama S, Sekine S, Kojima T, Mayama S, Kikuchi T, Hamano N, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. **Bubble liposomes and ultrasound exposure improve localized morpholino oligomer delivery into the skeletal muscles of dystrophic mdx mice.**; *Mol Pharm.*; 2014; Vol. 11; p1053-1061

Nelson DL, and Cox MM; **Lehninger Principles of Biochemistry**; W. H. Freeman; 2008; 1100p.

Nienhuis AW, Dunbar CE, and Sorrentino BP; **Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells.**; *Mol Ther.*; 2006; Vol. 13; p1031-1049

Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, and Sha J; **Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos.**; *Cell.*; 2014; Vol. 156; p836-843

Niwa H, Miyazaki J, and Smith AG; **Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells**; *Nat Genet.*; 2000; Vol. 24; p372–376

Omata D, Negishi Y, Suzuki R, Oda Y, Endo-Takahashi Y, and Maruyama K.; **Nonviral gene delivery systems by the combination of bubble liposomes and ultrasound.**; *Adv Genet.*; 2015; Vol. 89; p25-48

Oppici E, Montioli R, and Cellini B; **Liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase and the effects of mutations associated with Primary Hyperoxaluria Type I: An overview**; *Biochim Biophys Acta.*; 2015

Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, DeFeo AP, Gabriel R, Schmidt M, von Kalle C, Carlson DF, Maeder ML, Joung JK, Wagner JE, Voytas DF, Blazar BR, Tolar J; **TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa.**; *Mol Ther.*; 2013; Vol. 21; p1151-1159

Ott de Bruin LM, Volpi S, and Musunuru K; **Novel Genome-Editing Tools to Model and Correct Primary Immunodeficiencies.**; *Front Immunol.*; 2015; Vol. 6

Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisse S, Buttery PC, Watts C, Miskin J, Kelleher M, Deeley S, Iwamuro H, Lefaucœur JP, Thiriez C, Fenelon G, Lucas C, Brugières P, Gabriel I, Abhay K, Drouot X, Tani N, Kas A, Ghaleh B, Le Corvoisier P, Dolphin P, Breen DP, Mason S, Guzman NV, Mazarakis ND, Radcliffe PA, Harrop R, Kingsman SM, Rascol O, Naylor S, Barker RA, Hantraye P, Remy P, Cesaro P, and Mitrophanous KA; **Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial.**; *Lancet.*; 2014; Vol; 383; p1138-1146

Pearson S, Jia H, and Kandachi K; **China approves first gene therapy.**; *Nat Biotechnol.*; 2004; Vol. 22; p3-4

Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, and June CH; **Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases.**; *Nat Biotechnol.*; 2008 ; Vol. 26; p808-816

Pérez-Luz S, Abdulrazzak H, Grillot-Courvalin C, and Huxley C; **Factor VIII mRNA expression from a BAC carrying the intact locus made by homologous recombination.**; *Genomics.*; 2007; Vol. 90; p610-619

Ponder KP; The vectors of gene therapy. In: Kresina TF (Ed); **An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy**; John Wiley & Sons, Inc; 2001; p77-112

Porter DL, Hwang WT, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, Bagg A, Marcucci KT, Shen A, Gonzalez V, Ambrose D, Grupp SA, Chew A, Zheng Z, Milone MC, Levine BL, Melenhorst JJ, and June CH; **Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia.**; *Sci Transl Med.*; 2015; Vol. 7

Porteus MH; **Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases.**; *Mol Ther.*; 2006; Vol. 13; p438-446

Porteus MH, and Baltimore D; **Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells.**; *Science.*; 2003; Vol. 300

Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, and Matsuo M; **Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence.**; *Biochem Biophys Res Commun.*; 1996; Vol. 226; p445-449

Prescott LM, Harley JP, and Klein DA; **Microbiology**; De Boeck Supérieur; 2003; 1170p.

Prykhodzhiy SV, Rajan V, Gaston D, and Berman JN; **CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences.**; *PLoS One.*; 2015; Vol. 10

Pu J, Frescas D, Zhang B, and Feng J; **Utilization of TALEN and CRISPR/Cas9 technologies for gene targeting and modification**; *Exp Biol Med (Maywood).*; 2015

Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, and Dhawan A; **Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London**; *Cell Transplant.*; 2012; Vol. 21; p1-10

Purdue PE, Lumb MJ, Fox M, Griffo G, Hamon-Benais C, Povey S, Danpure CJ; **Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine:glyoxylate aminotransferase**; *Genomics.*; 1991; Vol. 10; p34-42

Purdue PE, Takada Y, Danpure CJ; **Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine:glyoxylateaminotransferase in primary hyperoxaluria type 1.**; *J Cell Biol.*; 1990; Vol. 111; p2341-2351

Qiu Z, Liu M, Chen Z, Shao Y, Pan H, Wei G, Yu C, Zhang L, Li X, Wang P, Fan HY, Du B, Liu B, Liu M, and Li D; **High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases**; *Nucleic Acids Res.*; 2013; Vol. 41

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, and Zhang F; **Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity**; *Cell.*; 2013a; Vol. 154; p1380-1389

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, and Zhang F; **Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.**; *Nat Protoc.*; 2013b; Vol. 8; p2281-2308

Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, and Joung JK; **FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing**; *Nat Biotechnol.*; 2012; Vol. 30; p460-465

Richard E; **Développement de vecteurs lentiviraux: application à la thérapie génique d'un modèle murin de protoporphyrie érythropoïétique**; ThD Sciences biologiques et médicales; Université Bordeaux II; 2003

Rio P, Baños R, Lombardo A, Quintana-Bustamante O, Alvarez L, Garate Z, Genovese P, Almarza E, Valeri A, Díez B, Navarro S, Torres Y, Trujillo JP, Murillas R, Segovia JC, Samper E, Surralles J, Gregory PD, Holmes MC, Naldini L, and Bueren JA; **Targeted gene therapy and cell reprogramming in Fanconi anemia.**; *EMBO Mol Med.*; 2014; Vol. 6; p835-848

Rosadas C, and Puccioni-Sohler M; **Relevance of retrovirus quantification in cerebrospinal fluid for neurologic diagnosis.**; *J Biomed Sci.*; 2015

Rudd MK, Mays RW, Schwartz S, and Willard HF; **Human artificial chromosomes with alpha satellite-based de novo centromeres show increased frequency of nondisjunction and anaphase lag.**; *Mol Cell Biol.*; 2003; Vol. 23; p7689-7697

Sabatino V, Russo MT, Patil S, d'Ippolito G, Fontana A, and Ferrante MI; **Establishment of Genetic Transformation in the Sexually Reproducing Diatoms Pseudo-nitzschia multistriata and Pseudo-nitzschia arenysensis and Inheritance of the Transgene.**; *Mar Biotechnol (NY).*; 2015; Vol. 17; p452-462

Salido E, Rodriguez-Pena M, Santana A, Beattie SG, Petry H, and Torres A; **Phenotypic correction of a mouse model for primary hyperoxaluria with adeno-associated virus gene transfer.**; *Mol Ther.*; 2011; Vol. 19; p870-875

- Salido EC, Li XM, Lu Y, Wang X, Santana A, Roy-Chowdhury N, Torres A, Shapiro LJ, and Roy-Chowdhury J; **Alanine-glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 2006; Vol. 103; p18249-18254
- Sander JD, and Joung JK; **CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting**; *Nat Biotechnol.*; 2014; Vol. 32; p347-355
- Sanders KL, Catto LE, Bellamy SR, and Halford SE; **Targeting individual subunits of the FokI restriction endonuclease to specific DNA strands.**; *Nucleic Acids Res.*; 2009; Vol. 37; p2105-2115
- Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker ML, Savino R, and Caskey CT; **Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 2000; Vol. 97; p1002-1007
- Santana A, Salido E, Torres A, and Shapiro LJ; **Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: a conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase.**; *Proc Natl Acad Sci USA.*; 2003; Vol. 100; p7277-7282
- Schiedner G, Hertel S, Johnston M, Biermann V, Dries V, and Kochanek S; **Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors.**; *J Virol.*; 2002; Vol. 76;1600-1609
- Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gebhardt F, Keil O, Lange C, Giese K, Kaufmann J, Khan M, and Dreves J; **First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors.**; *J Clin Oncol.*; 2014; Vol. 32; 4141-4148
- Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, Goodwin MJ, Hawkins JS, Ramirez CL, Batista LF, Artandi SE, Wernig M, and Joung JK; **In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases.**; *Stem Cells.*; 2011; Vol. 29; p1717-1726
- Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, Dadgar S, Bottazzi ME, Ghedin E, Pumfery A, and Kashanchi F.; **Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication.**; *Front Biosci.*; 2004; Vol. 9; p2388-2413
- Shah R, Cosstick R, and West SC; **The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts**; *EMBO J.*; 1997; Vol. 16; p1464-1472
- Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang X, and Skarnes WC; **Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects.**; *Nat Methods.*; 2014; Vol. 11; p399-402
- Sinclair RG, Jones EL, and Gerba CP; **Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review.**; *J Appl Microbiol.*; 2009; Vol. 107; p1769-1780
- Song J, Zhong J, Guo X, Chen Y, Zou Q, Huang J, Li X, Zhang Q, Jiang Z, Tang C, Yang H, Liu T, Li P, Pei D, and Lai L; **Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs**; *Cell Res.*; 2013; Vol. 23; p1059-1062
- Sun YJ, Wang XK, and Li BJ; **S-phase kinase-associated protein 2 expression interference inhibits breast cancer cell proliferation.**; *Genet Mol Res.*; 2015; Vol. 14; p9244-9252

Sung VM, and Lai MM; **Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system.**; *J Virol.*; 2002; Vol. 76; p912-917

Suresh SC, Selvaraju V, Thirunavukkarasu M, Goldman JW, Husain A, Alexander Palesty J, Sanchez JA, McFadden DW, and Maulik N; **Thioredoxin-1 (Trx1) engineered mesenchymal stem cell therapy increased pro-angiogenic factors, reduced fibrosis and improved heart function in the infarcted rat myocardium.**; *Int J Cardiol.*; 2015; Vol. 201; p517-528

Sutton RE, and Boothroyd JC; **Evidence for trans splicing in trypanosomes.**; *Cell.*; 1986; Vol. 47; p527-535

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S; **Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.**; *Cell.*; 2007; Vol. 131; p861-872

Takahashi K, and Yamanaka S; **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.**; *Cell.*; 2006; Vol. 126; p663-676

Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, and June CH; **Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV.**; *N Engl J Med.*; 2014; Vol. 370; p901-910

Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Anegón I, and Cost GJ; **Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs.**; *Nat Biotechnol.*; 2011; Vol. 29; p695-696

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM; **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.**; *Science.*; 1998; Vol. 282; p1145-1147

Truong DJ, Kühner K, Kühn R, Werfel S, Engelhardt S, Wurst W, and Ortiz O; **Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy.**; *Nucleic Acids Res.*; 2015; Vol. 43; p6450-6458

Uckun FM, Mitchell LG, Qazi S, Liu Y, Zheng N, Myers DE, Song Z, Ma H, and Cheng J; **Development of Polypeptide-based Nanoparticles for Non-viral Delivery of CD22 RNA Trans-splicing Molecule as a New Precision Medicine Candidate Against B-lineage ALL.**; *EBioMedicine.*; 2015; Vol. 2; p649-659

Urbinati F, Hargrove PW, Geiger S, Romero Z, Wherley J, Kaufman ML, Hollis RP, Chambers CB, Persons DA, Kohn DB, and Wilber A; **Potentially therapeutic levels of anti-sickling globin gene expression following lentivirus-mediated gene transfer in sickle cell disease bone marrow CD34+ cells.**; *Exp Hematol.*; 2015; Vol. 43; p346-351

Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, and Gotuzzo E; **Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection.**; *Lancet Infect Dis.*; 2007; Vol. 7; p266-281

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, and Jaenisch R; **One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering.**; *Cell.*; 2013; Vol. 153; p910-918

Wang Z, Zhou ZJ, Liu DP, and Huang JD; **Double-stranded break can be repaired by single-stranded oligonucleotides via the ATM/ATR pathway in mammalian cells.**; *Oligonucleotides.*; 2008; Vol. 18; p21-32

Wayengera M; **On the general theory of the origins of retroviruses.**; *Theor Biol Med Model.*; 2010; Vol. 7

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, and Sweeney HL; **PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.**; *Nature.*; 2007; Vol. 447; p87-91

Wierzbicki AS, and Viljoen A; **Alipogene tiparvovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency.**; *Expert Opin Biol Ther.*; 2013; Vol. 13; p7-10

Wiles MV, Qin W, Cheng AW, and Wang H; **CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design**; *Mamm Genome.*; 2015

Williams EL, Acquaviva C, Amoroso A, Chevalier F, Coulter-Mackie M, Monico CG, Giachino D, Owen T, Robbiano A, Salido E, Waterham H, and Rumsby G; **Primary hyperoxaluria type 1: update and additional mutation analysis of the AGXT gene**; *Hum Mutat.*; 2009; Vol. 30; p910-917

Wilton SD, Lloyd F, Carville K, Fletcher S, Honeyman K, Agrawal S, and Kole R; **Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides.**; *Neuromuscul Disord.*; 1999; Vol. 9; p330-338

Wu H, Wang Y, Zhang Y, Yang M, Lv J, Liu J, and Zhang Y; **TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 2015; Vol. 112

Xu ST, Ding X, Ni QF, and Jin SJ; **Targeting MACC1 by RNA interference inhibits proliferation and invasion of bladder urothelial carcinoma in T24 cells.**; *Int J Clin Exp Pathol.*; 2015; Vol. 8; p7937-7944

Xu SY, and Gupta YK; **Natural zinc ribbon HNH endonucleases and engineered zinc finger nicking endonuclease**; *Nucleic Acids Res.*; 2013; Vol. 41; p378-390

Yang L, Bailey L, Baltimore D, and Wang P; **Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 2006; Vol. 103; p11479-11484

Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, Aach J, Kim-Kiselak C, Briggs AW, Rios X, Huang PY, Daley G, and Church G; **Optimization of scarless human stem cell genome editing.**; *Nucleic Acids Res.*; 2013; Vol. 41; p9049-9061

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, and Wilson JM; **Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.**; *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 1994; Vol. 91; p4407-4411

Ye L, Muench MO, Fusaki N, Beyer AI, Wang J, Qi Z, Yu J, and Kan YW; **Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors**; *Stem Cells Transl Med.*; 2013; Vol. 2; p558-566

Zhang S, Li Y, Li L, Zhang Y, Gao N, Zhang Z, and Zhao H; **Phase I study of repeated intraepithelial delivery of adenoviral p53 in patients with dysplastic oral leukoplakia.**; *J Oral Maxillofac Surg.*; 2009; Vol. 67; p1074-1082

Zhang X, Roe SM, Hou Y, Bartlam M, Rao Z, Pearl LH, and Danpure CJ; **Crystal structure of alanine:glyoxylate aminotransferase and the relationship between genotype and enzymatic phenotype in primary hyperoxaluria type 1**; *J Mol Biol.*; 2003; Vol. 331; p643-652

Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao B, Liu Z, Lai S, Yi X, Guo L, Esteban MA, Zeng Y, Yang H, and Lai L; **Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer.**; *Cell Mol Life Sci.*; 2015; Vol. 72; p1175-1184

Sites Internet :

ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé; **Les médicaments de thérapie innovante (MTI, ATMP)**; <[http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-medicaments-de-therapie-innovante-MTI-ATMP/\(offset\)/4](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-medicaments-de-therapie-innovante-MTI-ATMP/(offset)/4)>; consulté le 14.08.15a

ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé; **Règlement européen sur les médicaments de thérapie innovante**; <[http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Reglement-europeen-sur-les-medicaments-de-therapie-innovante/\(offset\)/1](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Reglement-europeen-sur-les-medicaments-de-therapie-innovante/(offset)/1)>; consulté le 14.08.15b

ASGCT - American Society of Gene & Cell Therapy; **Gene Therapy and Cell Therapy Defined**; <<http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy--and-cell-therapy-defined>>; consulté le 06.08.15

Cochat P.; Centre de Référence des Maladies Rénale Rares, Université Lyon 1; **Hyperoxalurie primitive de type 1**; <http://www.chu-lyon.fr/web/attached_file/hyperoxalurie_primitive_type1.pdf?ComponentId=kmelia16&attachmentId=14365>; consulté le 23.09.15

Futura-Sciences; **La myopathie de Duchenne corrigée chez la souris**; Crédit AFM/Dominique Hoarau; <<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/vie-myopathie-duchenne-corrige-chez-souris-4738/>>; consulté le 13.09.15

Gene Therapy Net; **Gene Therapy Technology Explained**; <<http://www.genetherapynet.com/what-is-gene-therapy.html>>; consulté le 31.07.15

Haut Conseil des Biotechnologies; **Missions**; <<http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/fr/article/missions>>; consulté le 09.09.15

Inserm - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; **Thérapie génique**; <<http://www.inserm.fr/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/therapie-genique>>; consulté le 14.10.15

Monroe MR; **Plasmids 101: What is a plasmid?**; <<http://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>>; consulté le 04.09.15

NCBI - National Center for Biotechnology Information; **Taxonomy browser (Retroviridae)**; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=11632&lvl=6&p=genome&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock&filter=genome_filter>; consulté le 21.08.15

Nolan Lab; **The LTR Retroviral Promoter**; <http://web.stanford.edu/group/nolan/_OldWebsite/tutorials/retcl_3_ltrs.html>; consulté le 29.08.15

Orphanet; **Hyperoxalurie primitive type 1**; <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=93598&lng=FR>; consulté le 23.09.15

Palma Biotech; **Liposomes**; <<http://frod85.wix.com/palmabiotech#!liposomes/c14bj>>; consulté le 07.09.15

PTC Therapeutics; **Ataluren**; <<http://www.ptcbio.com/en/pipeline/ataluren-translarna/>>; consulté le 14.09.15

Sarepta Therapeutics; **Exon Skipping for Duchenne**; <<https://www.sarepta.com/pipeline/exon-skipping-duchenne>>; consulté le 08.10.15

Servier; **Banque d'images PowerPoint**; <<http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>>; consulté le 14.10.15

Shenzhen SiBiono GeneTech; **Gendicine - the first gene therapy product approved**; <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/1itdoc28402159_p28-29_20110831141403.pdf>; consulté le 20.08.15

Site du Genoscope; **Le projet Génome humain**; <<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Le-projet-Genome-humain.html#>>; consulté le 10.08.15

Société de Néphrologie; **Maladies rénales héréditaires : Oxalose (Hyperoxalurie primitive)**; <<http://www.soc-nephrologie.org/marhea/maladie/metabol/oxalose.htm>>; consulté le 22.09.15

UniQure; **Glybera**; <<http://www.uniqure.com/pipeline/glybera/>>; consulté le 16.08.15a

UniQure; **Alipogene Tiparvovec (Glybera®) - a Gene Therapy for LPLD**; <http://www.uniqure.com/uploads/Glybera%20pp%20Factsheet_lr.pdf>; consulté le 16.08.15b

Wiley J and Sons Ltd.; **Gene Therapy Clinical Trials Worldwide**; *J Gene Med.*; <<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>>; consulté le 31.07.15

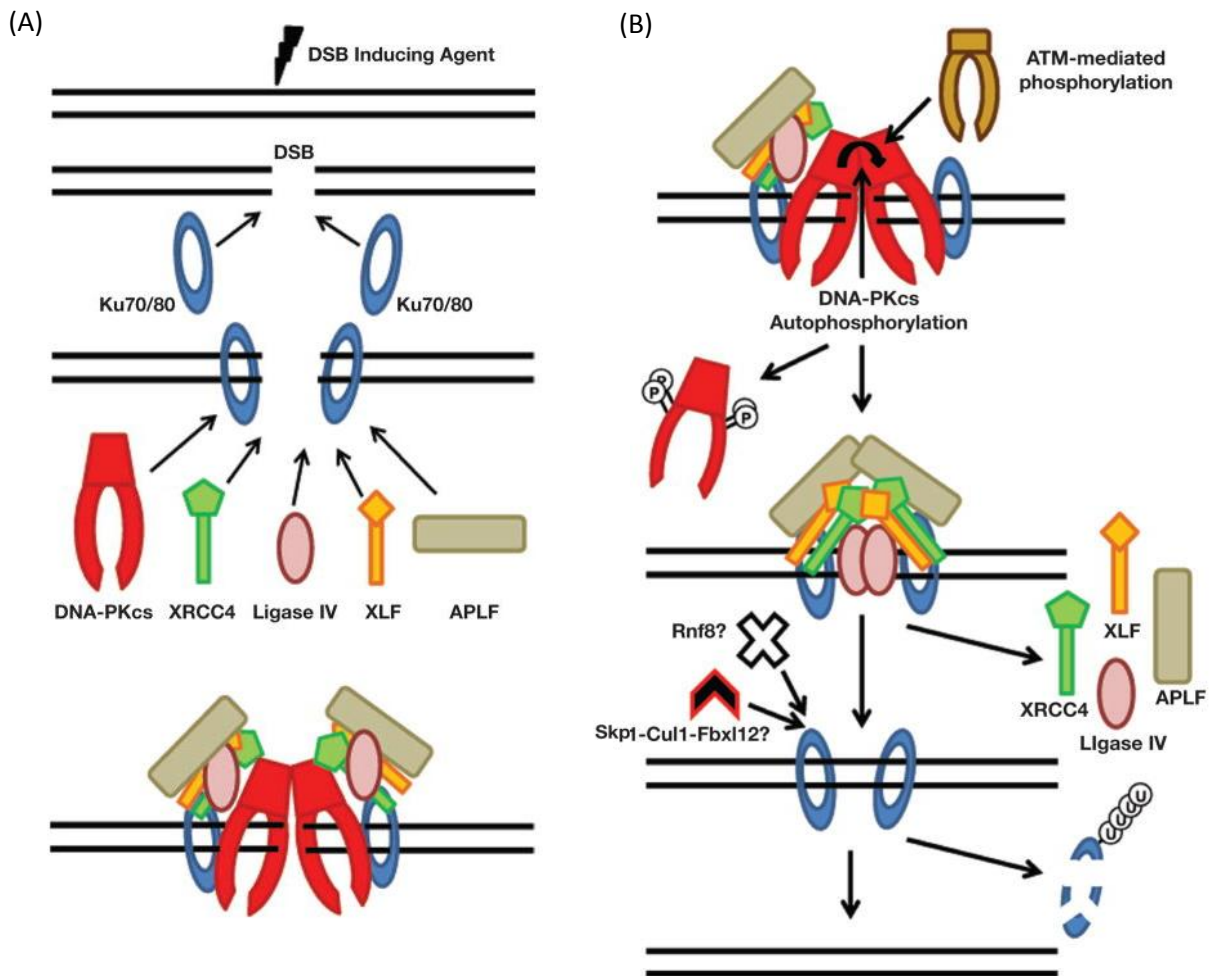


Figure S1 : Réparation des cassures double-brins de l'ADN par la voie NHEJ (d'après Davis and Chen, 2013 ; Helleday et al., 2007). (A) Reconnaissance des extrémités clivées de l'ADN et stabilisation des facteurs centraux du NHEJ (*Non Homologous End-Joining*). Après induction d'une cassure double brin (*Double-Strand Break, DSB*), les hétérodimères formés des sous-unités protéiques Ku70 et Ku80 se fixent aux extrémités clivées de la séquence d'ADN. Ces hétérodimères recrutent ensuite les sous-unités catalytiques de la DNA-PK (*Protein Kinase*), formant les DNA-PKcs (*DNA-PK complexes*) ; cette association attire le complexe Ligase IV/XRCC4/XLF/APLF vers le site de cassure. (B) Ligation des extrémités et dissolution du complexe de NHEJ. L'autophosphorylation et/ou la phosphorylation (par la kinase ATM) des sous-unités DNA-PK induit un changement de leur conformation, ce qui résulte en leur libération du site de clivage. La ligase IV procède alors à la ligation des extrémités simple-brins, en présence des facteurs XRCC4, XLF et APLF, puis le complexe dissout se détache de la séquence d'ADN. Enfin, les hétérodimères Ku70/80 sont ubiquitinylés (intervention potentielle des facteurs Rnf8 et Skp1-Cul1-Fbx12), ce qui résulte en leur dégradation et leur libération de l'ADN réparé.

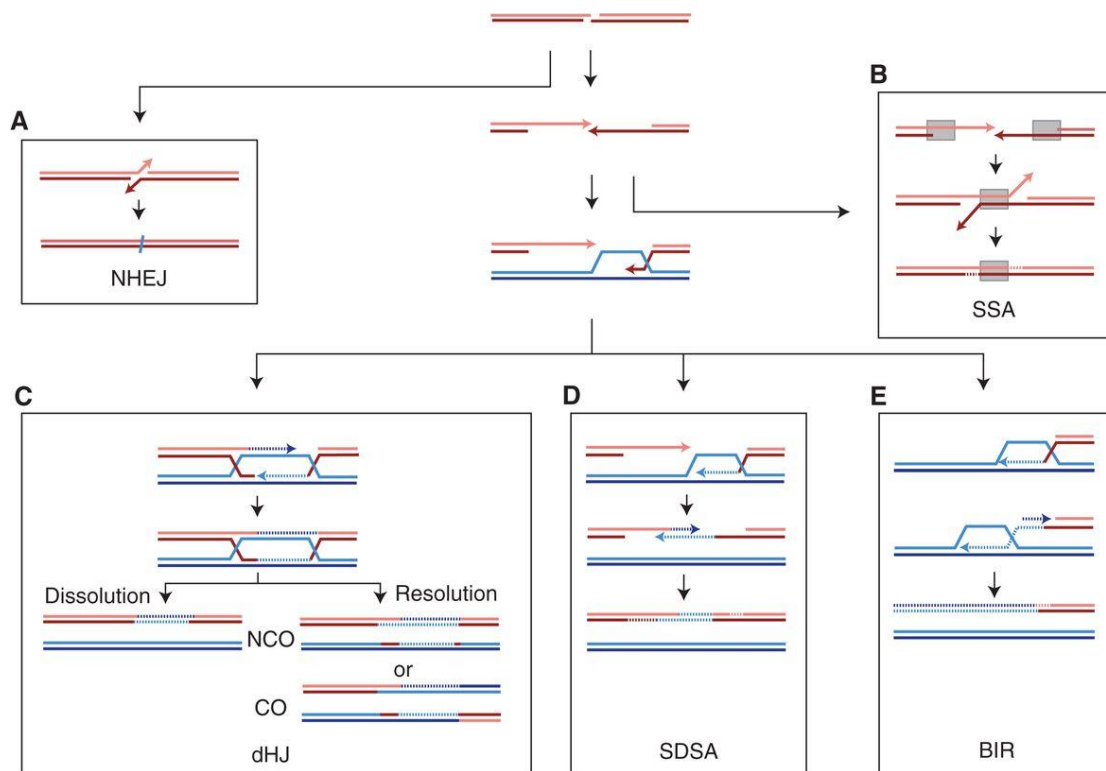


Figure S2 : Voies de réparation des cassures double-brins de l'ADN (Mehta and Haber, 2014). Après formation de la cassure double brin, la réparation de l'ADN peut être exécutée selon deux voies distinctes : la voie NHEJ (*Non Homologous End-Joining*, décrite précédemment) (A), et la voie de recombinaison homologue HDR (*Homology-Directed Recombination*), qui se traduit par plusieurs mécanismes différents, modélisés dans la figure ci-dessus. Le processus de recombinaison homologue est amorcé de façon identique pour tous les mécanismes : le clivage double brin de l'ADN est suivi d'une résection, produisant deux extrémités simple-brins sortantes en 3'. Lorsque la résection révèle la présence de répétitions homologues flanquantes, le mécanisme d'hybridation simple brin (*single-strand annealing*, SSA) intervient, conduisant à la délétion de la séquence interposée entre les répétitions homologues (B). Les autres types de recombinaison homologue dépendent de la reconnaissance et de l'appariement de l'une des extrémités sortantes en 3' avec des séquences homologues intactes, présentes sur une chromatide sœur, un locus allélique ou localisées de façon ectopique sur le génome. Cette extrémité sortante devient le substrat de la machinerie de réparation, exécutant l'invasion de la séquence double brin homologue en formant une boucle de déplacement. La voie comportant une double jonction de Holliday (*double Holliday junction*, dHJ, encore appelée *double-strand break repair*) (C) implique la ligation de l'extrémité 3' sortante à l'extrémité 5' correspondante pour stabiliser la boucle. La structure dHJ peut être résolue par dissolution médiée par une hélicase et une topoisomérase (« Dissolution »), ce qui conduit à l'absence de *crossover* (CO, recombinaison réciproque ; NCO = *noncrossover*), ou être clivée par des « *HJ resolvases* » (« Resolution ») pour produire des séquences recombinées (CO) ou non (NCO). Dans le modèle d'« hybridation des brins synthèse-dépendante » (*synthesis-dependent strand-annealing*, SDSA) (D), la boucle est dissociée et la séquence d'ADN simple brin ainsi libérée s'hybride avec la séquence complémentaire située à l'autre extrémité de la cassure double brin. La réaction est complétée par une synthèse d'ADN fermant la brèche résiduelle, suivie d'une ligation des extrémités. Seules des séquences non recombinées sont formées. Enfin, le modèle de « réplication induite par la cassure » (*break-induced replication*, BIR) (E) implique la synthèse simultanée des deux brins clivés et résulte en une perte de l'hétérozygotie ou, si la matrice de recombinaison est localisée de façon ectopique, à une translocation non réciproque. Les séquences d'ADN nouvellement synthétisées sont représentées en pointillés de la même couleur que la séquence matrice ; les flèches de couleur indiquent l'orientation des extrémités 3' des séquences correspondantes.

La résolution d'une cassure double-brin par le mécanisme de recombinaison homologue est réalisée de façon aléatoire au sein des cellules, selon l'un des modèles présentés ci-dessus.

Exon 4 :

Séquence endogène (brin sens) :

5' GGCCTGGCCCAGCACAAGCCAGTGCTGCTGTTCTTAACCCACGGGGAGTCGTCCACCGGCGTGCTGCAGCCCCTTGATGGCTTCGGGGAACTCTGCCACAG 3'

Matrice oligodésoxyribonucléotidique :

5'agGGCCTGGCCCAGCACAAGCCAGTGCTGCTGTTCTTAACACACGGGGAGTCGTCCACCGGCGTGCTGCAGCCCCTTGATGGCTTCGGGAAGCTCTCCACAGgtgagcc
tggccccagggcgggtggactggagcacagctcagagccaggctatggggagggg 3'

Exon 7 :

Séquence endogène (brin sens) :

5'AAAGAAGATGTACTCCCGCAAGACGAAGCCCTTCTCCTTCTACCTGGACATCAAGTGGCTGGCCAACTTCTGGGGCTGTGACGACCAGCCCAGGAT 3'

Matrice oligodésoxyribonucléotidique :

AAAGAAGATGTACTCTCGCAAGACGAAGCCCTTCTCCTTCTACCTGGACAACAAGTGGCTGGCCAACTTCTGGGGCTGTGACGATCAGCCCAGGATgtgaggcctggcag
ggatgggaaggtggagggcgctgggcatggct 3'

Figure S3 : Systèmes de recombinaison homologue des exons 4 et 7 du gène *AGXT*, médiée par les CRISPR/Cas9 ; correspondance avec les séquences endogènes. Majuscules : séquences exoniques ; minuscules : séquences introniques. Séquences soulignées : positions des codons mutés chez les patients atteints de PH1, avec emplacement du nucléotide substitué indiqué en rouge, bien que les séquences représentées soient natives ; les positions correspondent, dans le sens 5' → 3', aux mutations 508G>A et 518G>A (respectivement G170R et C173Y sur la protéine AGT) pour l'exon 4, et 731T>C (I244T sur la protéine AGT) pour l'exon 7. Surlignage bleu clair : projection, sur la matrice, des sites reconnus par les ARN guides transcrits à partir des protospacers (nommés de 5' vers 3') 42 et 41 pour l'exon 4, et 72 et 71 pour l'exon 7. Surlignage mauve : PAM. Un PAM a été muté par exon : substitution 462G>A pour l'exon 4, et 696G>T pour l'exon 7 (le nucléotide substitué est surligné en jaune). Surlignage vert : substitution d'un nucléotide entraînant l'apparition d'un site de restriction, utile à l'analyse ultérieure des génomes cellulaires par hydrolyse enzymatique ; exon 4 : substitution 513A>G créant le site de restriction *SacI* (5'GAGCT[^]C3'), exon 7 : substitution 765C>T créant le site de restriction *MboI* (5'[^]GATC3'). Comme précédemment, le choix des mutations générées a été effectué en tenant compte de la redondance du code génétique et de la fréquence d'utilisation des codons ; de plus, l'analyse ultérieure des génomes impliquant une série de réactions de PCR préalables à leur hydrolyse enzymatique, nous nous sommes assurés de la présence unique de chaque site de restriction dans les régions amplifiées.

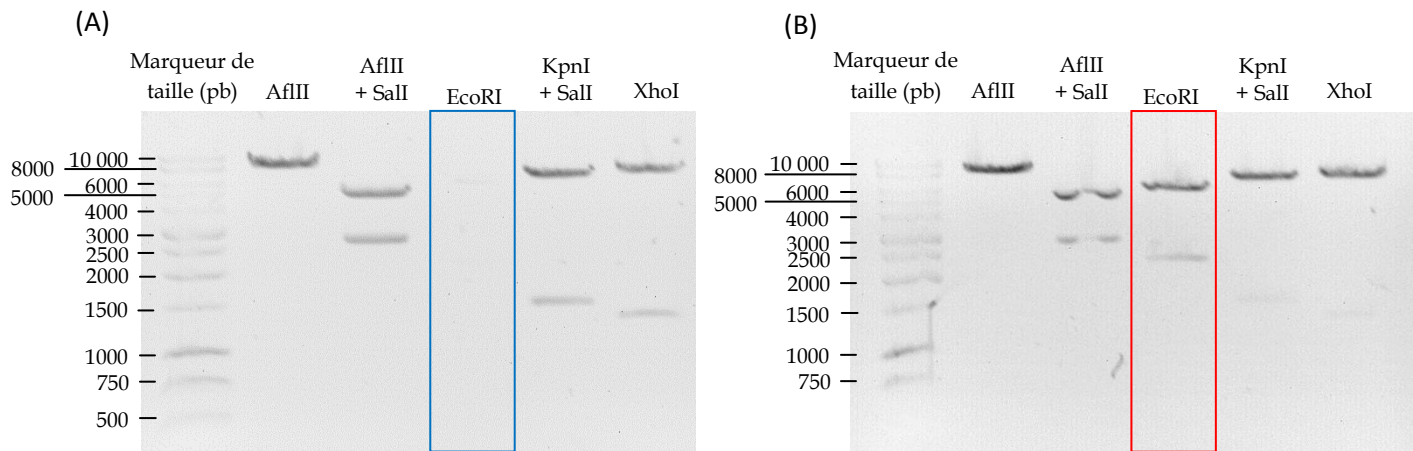


Figure S4 : Profils de restriction du plasmide p1180 5'arm-*cDNA* AGXT-pA BGH-PGK-Puro-3'arm selon les conditions d'hydrolyse, après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%. Les enzymes ayant clivé le plasmide sont indiquées au-dessus de chaque profil électrophorétique correspondant. Ces images sont le résultat de deux expériences d'hydrolyse différentes ; leur assemblage (cadre rouge de la figure (B) inséré à la place du cadre bleu de la figure (A)) constitue la figure 38.

Résumé

L'hyperoxalurie primitive de type 1 est une pathologie métabolique rare, de transmission autosomale récessive, caractérisée par une surproduction d'oxalate due au déficit fonctionnel d'une enzyme spécifique du peroxysome des hépatocytes, l'alanine glyoxylate aminotransférase (AGT). Le gène *AGXT* codant pour l'AGT humaine est situé au locus 2q37.3. De nombreux variants/mutants pathologiques de ce gène ont été identifiés : variants polymorphes, mutations non-sens et faux-sens, mutations des sites d'épissage, délétions et insertions. Actuellement, la seule thérapie curative disponible consiste en une greffe hépatorénale allogénique qui, bien qu'efficace, est associée à d'importants facteurs de variabilité, ainsi qu'à une morbidité et une mortalité significatives.

Nous proposons ici de développer une approche alternative de thérapie génique, élaborée à partir d'hépatocytes génétiquement corrigés dérivés de cellules autologues aux patients ; pour cette étude, nous nous focalisons sur le cas de deux patients, l'un homozygote pour la mutation I244T de la protéine AGT, et le second hétérozygote composite G170R/C173Y. Dans un premier temps, nous souhaitons modifier par recombinaison homologue dirigée le génome de fibroblastes de patients, afin qu'ils expriment de façon physiologique une version sauvage du gène *AGXT*. Ces fibroblastes seront alors reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) par transduction de vecteurs Sendai recombinants, exprimant les facteurs de pluripotence Oct3/4, Sox2, Klf4, et c-Myc. Après sélection clonale, les iPSCs corrigées seront finalement orientées vers la lignée hépatocytaire à l'aide de combinaisons de cytokines.

Deux stratégies complémentaires ont été envisagées pour modifier génétiquement les fibroblastes par recombinaison homologue : 1) une thérapie additive ciblée « universelle », impliquant l'insertion de la séquence d'ADN complémentaire (ADNc) du gène *AGXT* humain dans la région 5'UTR endogène, et permettant l'expression physiologique du transgène et 2) une correction ciblée du gène *AGXT* endogène, adaptée à chaque type de mutation, et consistant en une substitution de la région mutée par sa version sauvage. Afin de favoriser la survenue d'événements de recombinaison ciblée, chaque approche inclut la création de cassures double-brins de l'ADN au niveau de la région cible, par les systèmes TALENs (stratégie 1), et CRISPR/Cas9 (stratégie 2).

Les travaux réalisés depuis l'initiation du projet ont abouti au développement complet des outils de manipulation génique, qui ont été introduits au sein de fibroblastes primaires sauvages et homozygotes pour la mutation I244T de la protéine AGT, ainsi que dans une lignée cellulaire HepG2 capable d'exprimer la séquence ADNc *AGXT*. Les premiers résultats obtenus indiquent une toxicité cellulaire des différents systèmes de recombinaison, susceptible de traduire l'existence de clivages génomiques favorables à l'apparition d'événements de recombinaison homologue. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour, d'une part, affirmer l'existence de ces cassures et mettre en évidence l'apparition d'événements de recombinaison homologue, et d'autre part évaluer le taux d'expression de la protéine AGT dans les cellules HepG2 recombinées.

Mots-clés : thérapie génique ; TALENs ; CRISPR/Cas ; recombinaison homologue ciblée ; hyperoxalurie primitive de type I

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.