

Année 2008

**INTERÊT DU MODÈLE CANIN
EN THÉRAPIE GÉNÉRIQUE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Pauline VANBELLE

Née le 8 septembre 1983 à Montreuil sous Bois (93)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : ABITBOL Marie

Maître de Conférences à l'ENVA

Assesseur : BOSSE Philippe

Professeur à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires : MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences -UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur -UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences -UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences -UNITE : BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences	- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences - UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences -DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur -DISCIPLINE : GENETIQUE MEDICALE ET CLINIQUE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences -DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur -DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié
---	---

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHOLON Jean-Louis , Professeur

- UNITE DE MEDECINE M. POUCHOLON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel - UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel -UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mlle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)	- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel -UNITE D'OPHTALMOLOGIE M. CLERC Bernard, Professeur* Mlle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARGINAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mlle HALOS Léniaïg, Maître de conférences -UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur
--	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences -UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences - DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences	- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences* - UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences
--	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

REMERCIEMENTS

A Monsieur, Madame le Professeur

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A Mademoiselle Marie Abitbol

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui a dirigé ce travail.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance, pour ses compétences et sa disponibilité.

A Monsieur Philippe Bossé

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui a accepté de juger cette thèse et de faire partie du jury.

Je remercie mes parents ainsi que ma sœur pour l'amour qu'ils me portent et leur soutien.

Mes amis, qui se reconnaîtront. Ceux qui ont toujours été là, ceux qui le sont, de près ou de loin.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES.....	7
TABLE DES TABLEAUX.....	11
TABLE DES ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	17

I – LA THERAPIE GENIQUE CHEZ L'HOMME ET LES MODELES ANIMAUX CLASSIQUES.....19

<u>A – Qu'est-ce que la thérapie génique.....</u>	<u>19</u>
1 – Historique.....	19
a – Les débuts de la thérapie génique.....	19
b – La première réussite.....	21
2 – Les aspects techniques de la thérapie génique.....	24
a – Définition.....	24
b – Thérapie génique somatique ou germinale ?.....	26
c – Les vecteurs de la thérapie génique.....	27
• Vecteurs viraux.....	27
- Vecteurs adénoviraux.....	28
- Vecteurs rétroviraux.....	34
- Vecteurs dérivés de l'AAV.....	41
- Vecteurs herpesviraux.....	45
- Vecteurs chimériques.....	51
• Vecteurs non viraux.....	53
• Les méthodes physiques: électroporation et injection sans aiguille.....	56
d – Administration du vecteur.....	58
• La thérapie génique <i>ex vivo</i>	58
• La thérapie génique <i>in vivo</i>	59
• La thérapie génique <i>in situ</i>	60
3 – Des stratégies sans limites.....	61
a – Les maladies génétiques candidates à la thérapie génique.....	61
b – Le cancer, une maladie à la génétique complexe.....	62
c – Thérapie génique des maladies virales.....	64
d – Gène vaccin.....	64
e – Thérapie génique et diverses maladies acquises.....	64

<u>B – Les modèles animaux en thérapie génique</u>	65
1 – La Souris : intérêt et limites.....	65
2 – Autres modèles animaux.....	67
a – Le modèle félin.....	67
b – Le modèle équin.....	69
c – Le modèle bovin.....	70
d – Le modèle porcin.....	71
e – Le modèle singe.....	72
<u>C – La thérapie génique chez l’Homme</u>	74
1 – La thérapie génique humaine en 2007.....	74
a – Répartition des essais cliniques selon les continents.....	74
b – Les maladies à l'étude.....	76
c – Les vecteurs de thérapie génique.....	76
d – Les gènes transférés	77
e – Evolution du nombre d'essais cliniques de 1987 à 2007.....	78
f – Les phases des essais cliniques actuels.....	79
• Etude de phase I.....	79
• Etude de phase II.....	79
• Etude de phase III.....	79
• Etude de phase IV.....	79
2 – La thérapie génique: problèmes éthiques et législation.....	80
a – Thérapie génique: problèmes éthiques, sociologiques et financiers.....	81
b – Aspects législatifs et réglementaires de la thérapie génique.....	82
b1 – La réglementation française.....	82
• Procédure d'autorisation d'un essai clinique de thérapie génique.....	82
• Réglementation française des produits de thérapie génique.....	84
b2 – Les législations aux Etats-Unis et en Europe.....	86
• En Europe.....	86
• Aux Etats-Unis.....	87

II – LE MODELE CANIN EN THERAPIE GENIQUE.....	89
A – Données récentes de génétique canine.....	89
1 – Origine des canidés et diversité génétique.....	89
2 – Les maladies génétiques chez le Chien.....	92
3 – Les différents modes de transmission des maladies génétiques.....	94
a – Hérité mendélienne et hérité multifactorielle.....	94
b – Transmission autosomique récessive.....	95
c – Transmission autosomique dominante.....	96
d – Transmission liée à l’X.....	97
e – Le mode de transmission maternel.....	99
4 – Connaissance du génome canin.....	99
B – Données de physiologie canine.....	103
1 – Développement embryonnaire.....	103
a – Premières étapes de l’évolution du zygote après la fécondation.....	103
b – Formation des organes et conséquences sur les malformations.....	104
2 – Les différents stades de la vie post natale du Chien.....	105
a – La période néonatale.....	106
b – La période de transition.....	106
c – La période de socialisation.....	106
d – La période juvénile.....	107
3 – Physiologie neuromusculaire et organes des sens.....	108
a – Les muscles chez le Chien.....	108
b – Organes des sens.....	109
4 – Le système immunitaire du Chien.....	109
a – Introduction.....	109
b – Les cellules de l’immunité.....	110
• La lignée lymphoïde.....	110
• La lignée myéloïde.....	111
c – Autres agents.....	111
• Le complément.....	112
• Les anticorps.....	113
d – Immunité à médiation humorale.....	115

• La réponse anticorps.....	115
• Les mécanismes de la réponse anticorps.....	116
e – Immunité à médiation cellulaire.....	117
• Activation des LTc.....	117
• Rôle central des macrophages.....	118
f – La réaction immunitaire lors d’une infection virale.....	118
C – Particularités et pertinence du modèle canin en thérapie génique.....	120
1 – Nécessité d’un modèle intermédiaire.....	120
2 – Entretien du Chien en animalerie.....	122
a – L’alimentation.....	122
b – Choix de la race.....	122
c – Logement.....	123
d – Hygiène.....	124
3 – Médecine et chirurgie du Chien.....	124
D – Les essais de thérapie génique chez le Chien.....	126
1 – Historique et premier succès.....	126
2 – Essais en cours, en France et dans le monde.....	127
 III – ILLUSTRATIONS DE L'INTERÊT DU MODELE CANIN EN THERAPIE GENIQUE.....	 131
A – La dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien chez le Briard.....	131
1 – Historique de la maladie.....	131
2 – La maladie génétique chez l'Homme et chez le Briard.....	133
a – Déterminisme génétique.....	133
b – Signes cliniques et lésions associés.....	134
3 – Pourquoi espérer de la thérapie génique?.....	136
4 – La thérapie génique chez le Briard, de ses débuts à aujourd'hui.....	137
a – Etude phénotypique détaillée de la RPED.....	137
b – Analyse moléculaire de la RPED.....	142
c – Premier essai de thérapie génique.....	143
d – Le Chien, un modèle pour la thérapie de la RPED.....	144
B – La myopathie de Duchenne chez le Golden Retriever.....	149
1 – La dystrophine.....	149
a – Structure et fonctions de la cellule musculaire.....	150
• Organisation cellulaire.....	150

• L'environnement de la cellule musculaire.....	...154
• La croissance du muscle après la naissance.....	156
b – Le gène de la dystrophine et ses produits.....	156
c – Rôles de la dystrophine.....	..156
2 – La dystrophie musculaire de Duchenne chez l'Homme.....	156
a – Origines et transmission de la maladie.....	157
b – Présentations clinique et histologique succinctes de la DMD.....	159
3 – La dystrophie musculaire de Duchenne chez le Chien GRMD.....	160
a – Historique et origine de la maladie.....	160
b – Présentations clinique et lésionnelle de la myopathie de Duchenne chez le Chien GRMD.....	162
4 – Le Chien Golden Retriever, un modèle parfait pour la myopathie de Duchenne chez l'Homme?.....	164
a – Comparaison clinique homme/chien.....	164
b – Utilité du modèle GRMD.....	166
• Le Chien myopathe, un animal difficile à élever au sein d'une colonie.....	166
• Le Golden Retriever se prête bien aux expérimentations.....	166
5 – Myopathie de Duchenne et thérapie génique chez le Golden Retriever: état des lieux et perspectives.....	167
a – Utilisation de la thérapie génique chez le Chien GRMD: état des lieux.....	167
• Utilisation de vecteurs viraux.....	168
- Utilisation des herpesvirus simplex.....	168
- Utilisation des rétrovirus.....	168
- Utilisation des adénovirus.....	168
- Utilisation des virus associés aux adénovirus.....	169
• Les problèmes rencontrés.....	170
- Les effets toxiques des virus et leur pouvoir immunogène.....	170
- La voie d'administration.....	170
- La quantité de dystrophine nécessaire et sa répartition.....	171
- Objectiver une réussite de thérapie génique.....	171
- La durée d'expression du gène introduit.....	171
• Myopathie de Duchenne et thérapie génique : état des lieux.....	171
- Chez le modèle canin.....	171
- Chez l'Homme.....	172
b – Les nouvelles pistes de recherche.....	173
• L'utilisation d'oligonucléotides d'ADN/ARN.....	173
• Le saut d'exon.....	175
• La thérapie cellulaire.....	178
• La thérapie pharmacologique.....	180

CONCLUSION.....	181
BIBLIOGRAPHIE.....	183

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Principe du premier essai de thérapie génique (1989).....	20
Figure 2 : Origine du déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DISC-X).....	22
Figure 3 : Principe de la thérapie génique appliquée aux patients atteints de DICS lié à l’X.....	23
Figure 4 : Etapes cellulaires menant à l’expression d’un gène.....	25
Figure 5 : Principe de thérapie génique.....	26
Figure 6 : Structure d’un adénovirus.....	28
Figure 7 : Génome adénoviral constitué de deux brins d’ADN.....	29
Figure 8 : Schématisation du cycle adénoviral.....	30
Figure 9 : Structure d’un rétrovirus.....	35
Figure 10 : Représentation schématique du génome rétroviral.....	36
Figure 11 : Cycle de réplication d’un rétrovirus.....	37
Figure 12 : Principe de construction rétrovirale.....	38
Figure 13 : Cycle viral abortif d’une particule virale contenant un virus défectif véhiculant un gène d’intérêt.....	38
Figure 14 : Cycle viral d’un AAV.....	42
Figure 15 : Génome d’un AAV et production de vecteurs dérivés d’AAV.....	43
Figure 16 : Structure d’un HSV-1.....	46
Figure 17 : Structure du génome viral de HSV-1.....	47
Figure 18 : Principe des vecteurs amplicons.....	50
Figure 19 : Séquence schématique des évènements conduisant à la transfection par l’intermédiaire de vecteurs polycationiques.....	55
Figure 20 : Thérapie génique <i>in vivo</i> et thérapie génique <i>ex vivo</i>	60
Figure 21 : La thérapie génique d’augmentation.....	61
Figure 22 : Deux approches de thérapie génique du cancer.....	63
Figure 23 : Place de la citrulline dans le cycle de l’urée.....	70
Figure 24 : Répartition géographique par continent des essais cliniques de thérapie génique chez l’Homme en 2007.....	75
Figure 25 : Répartition géographique par pays des essais de thérapie génique chez l’Homme en 2007.....	76

Figure 26 : Les différents types de vecteurs utilisés dans les essais de thérapie génique en 2007...	77
Figure 27 : Les différentes catégories de gènes transférés dans les essais de thérapie génique en 2007.....	77
Figure 28 : Nombre d'essais de thérapie génique validés par année, de 1989 à 2007.....	78
Figure 29 : Répartition par phase des essais cliniques de thérapie génique en 2007.....	80
Figure 30 : Procédure d'autorisation d'un essai clinique de thérapie génique.....	83
Figure 31 : Bilan : Encadrement législatif et réglementaire des essais cliniques et des produits de thérapie génique.....	85
Figure 32 : Phylogénie de la famille des Canidés.....	90
Figure 33 : Le mode de transmission autosomique récessif.....	95
Figure 34 : Le mode de transmission autosomique dominant.....	96
Figure 35 : Le mode de transmission récessif lié à l'X.....	97
Figure 36 : Le mode de transmission dominant lié à l'X.....	98
Figure 37 : Le mode de transmission lié à l'Y.....	98
Figure 38 : Tasha, première chienne Boxer au génome séquencé.....	102
Figure 39 : Principales périodes critiques sensibles au cours du développement embryonnaire....	105
Figure 40 : Développement des réflexes et des réponses chez le Chien durant sa croissance.....	107
Figure 41 : Cellules présentant l'antigène.....	112
Figure 42 : Organisation générale d'une immunoglobuline.....	114
Figure 43 : Cellules du système immunitaire.....	115
Figure 44 : Fonctions des anticorps.....	117
Figure 45 : Réponses immunitaires aux virus.....	119
Figure 46 : Coupe schématique transversale de l'œil d'un chien.....	132
Figure 47 : Fond d'œil d'un sujet humain atteint d'amaurose congénitale de Leber.....	134
Figure 48 : Apparence normale du fond d'œil d'un Briard de 10 mois atteint de RPED.....	138
Figure 49 : ERG chez un chien normal et chez un chien atteint de RPED.....	139
Figure 50 : Rétine en coupe transversale, observée au microscope électronique.....	145
Figure 51 : Station d'enregistrement des mouvements oculaires des Briard.....	146
Figure 52 : Enregistrement des mouvements horizontaux, verticaux et de la trajectoire du nystagmus sur les deux yeux d'un chien atteint de RPED.....	147

Figure 53 : Enregistrement des mouvements horizontaux, verticaux et de la trajectoire du nystagmus sur les deux yeux d'un chien traité par thérapie génique.....	148
Figure 54 : Les trois types de muscles.....	151
Figure 55 : Anatomie microscopique d'une fibre musculaire squelettique.....	153
Figure 56 : Architecture d'une fibre musculaire dans la région de la plaque motrice.....	155
Figure 57 : L'hypothèse de la rupture du cadre de lecture dans les cas de DMD.....	158
Figure 58 : Sections musculaires observées au microscope électronique.....	160
Figure 59 : Positionnement des mutations canines connues sur le gène DMD.....	161
Figure 60 : Photographie d'un chien mâle atteint par la GRMD (animal de 8 mois).....	163
Figure 61 : Age d'apparition des différents symptômes chez le chien atteint par la GRMD.....	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux les plus utilisés actuellement en thérapie génique.....	53
Tableau 2 : Maladies génétiques et caractères d'intérêt animaux répertoriés en 2007.....	94
Tableau 3 : Recensement des essais cliniques de thérapie génique effectués chez le Chien publiés entre janvier 2005 et avril 2008.....	128

TABLE DES ABREVIATIONS

AAV	<i>Adeno-associated Virus</i>
ADA	Adénosine Désaminase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique cyclique
AFM	Association Française de lutte contre les Myopathies
AFSSAPS	Association Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMD	Alpha-mannosidose
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AO	Oligonucléotide Antisens
ARN	Acide Ribonucléique
ARSA	Arylsulfatase A
BMD	<i>Becker Muscular Dystrophy</i>
Cap	Gène codant pour des protéines de capside
CAR	Récepteur commun aux Coxsackievirus et aux Adénovirus
CCNE	Comité Consultatif National d’Ethique
CCPPRB	Comité Contre la Protection des Personnes de prêtant à une Recherche Biomédicale
CGB	Comité d’étude de la dissémination des produits issus de génie génique
CGG	Comité de Génie Génétique
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CSNB	Cécité congénitale stationnaire nocturne
CPAG	Cellule présentatrice d’Antigène
CSP	Comité de Spécialités Pharmaceutiques
DGC	<i>Dystrophy Glycoprotein Complex</i>
DICS	Déficit Immunitaire Combiné Sévère
DMD	<i>Duchenne Muscular Dystrophy</i>
DOGS	Diocadécylamidoglycyl-spermine
E	Exon
ECG	Electrocardiogramme
EMG	Electromyogramme
ERG	Electrorétinogramme
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>

FAH	Fumarylacétoacétate Hydrolase
Fc	Fragment cristalloïde
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
GABP	<i>GA-Binding Protein</i>
Gb	Gigabase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRMD	<i>Golden Retriever Muscular Dystrophy</i>
HCF	<i>Host Cell Factor</i>
HCN	Nucléotide Cyclique d'Hyperpolarisation
HDAd	<i>Helper-Dependant Adenoviruses</i>
HFMD	<i>Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
Hz	Hertz
ICP	Phosphoprotéine transrégulatrice
IE	<i>Immediate Early</i>
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRL	<i>Long Initial Repeat</i>
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
IRS	<i>Initial Repeated Sequency</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramme
KDa	Kilodalton
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
LTc	Lymphocyte T cytotoxique
LTh	Lymphocyte T <i>helper</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
Mb	Mégabase
mdx	<i>X-linked muscular dystrophy</i>
NAFX	<i>eXpanded Nystagmus Acuity Function</i>

NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK	<i>Natural Kiler</i>
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
OMIA	<i>Online Mendelian Inheritance in Animals</i>
Ori	Origine de réplication
Pb	Paire de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyéthylènimine
PGC	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Co-activator alpha</i>
PMO	Oligomère Morpholinos Phosphorodiamate
PTG	Produit de Thérapie Génique
rAAV	<i>recombinant AAV</i>
RAC	<i>Recombinant DNA Advisory Committee</i>
Rep	Gène codant pour des protéines de réplication
RPE	<i>Retinal Pigment Epithelial</i>
RPED	<i>Retinal Pigment Epithelial Dystrophy</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SU	<i>Surface Unit</i>
TM	Transmembranaire
TRL	<i>Long Terminal Repeat</i>
TRS	<i>Terminal Repeat Sequency</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP	<i>Viral Protein</i>
WAS	<i>Wiskott-Aldrich Syndrom</i>

INTRODUCTION

La thérapie génique regroupe l'ensemble des technologies permettant le transfert d'ADN à visée thérapeutique dans un organisme vivant. Elle recouvre donc deux notions très différentes : la thérapie génique somatique et la thérapie génique germinale. Dans le présent exposé nous ne développerons pas la thérapie génique germinale qui vise à modifier toutes les cellules d'un individu, y compris ses cellules germinales. Elle s'effectue au stade embryonnaire et ne concerne que quelques modèles animaux très précis tels que la Souris. Le domaine de la thérapie génique des cellules somatiques, porteur de réelles promesses, a cependant connu à ses débuts de nombreux échecs. Cependant, depuis quelques années, l'efficacité de la thérapie génique, jusque là théorique, s'est enfin imposée chez l'animal ainsi que chez l'Homme pour des maladies variées.

Ces avancées ont été permises grâce aux nombreuses recherches effectuées sur les modèles animaux. L'espèce canine s'est imposée grâce aux nombreuses similitudes, essentiellement phylogéniques et physiologiques, qu'elle présente en commun avec l'Homme. A côté de modèles plus réduits comme la Souris, le Chien offre de nouvelles perspectives thérapeutiques et permet l'exploration chez un modèle de grande taille de multiples maladies génétiques.

Après avoir rappelé le principe et l'importance de la thérapie génique en France et dans le monde, nous verrons en quoi le Chien regroupe des atouts jusque là inégalés lui conférant son statut actuel de modèle expérimental de choix. Enfin, deux illustrations rendront compte des travaux récemment effectués dans l'espèce canine en thérapie génique qui laissent espérer une application thérapeutique à court terme chez l'Homme : la myopathie de Duchenne chez le Golden Retriever et la dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien chez le Briard.

I –LA THERAPIE GENIQUE CHEZ L’HOMME ET LES MODELES ANIMAUX CLASSIQUES

Le degré de connaissance en génétique canine ne cesse d'augmenter. Les gènes responsables de nombreuses maladies et caractères chez les animaux de compagnie sont maintenant répertoriés [9]. Ces percées génétiques ne sont pas uniquement susceptibles de jouer un rôle dans le diagnostic et la prévention de maladies, passant par une conduite d'élevage sélective; elles précèdent aussi la mise en œuvre de thérapies géniques cliniquement réalisables.

Après avoir défini les principes généraux de la thérapie génique, nous ferons un état des lieux de l'utilisation de cette technique dans le domaine de la recherche humaine et canine afin de traduire l'ampleur de son avancée. Enfin, nous considérerons les problèmes rencontrés par la thérapie génique en tant que technologie intervenant sur des gènes, en abordant les interrogations suscitées mais également la réglementation qui la régit.

A – Qu'est-ce que la thérapie génique?

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à faire pénétrer de l'ADN dans les cellules ou les tissus d'un individu, pour traiter ou prévenir une maladie. Elle vise à remplacer ou compléter un allèle mutant défectueux par un allèle fonctionnel, ou à sur exprimer une protéine dont l'activité aurait un impact thérapeutique. Actuellement, le terme de thérapie génique regroupe donc les thérapeutiques biotechnologiques visant à réparer une anomalie de l'ADN ou faisant exprimer une protéine thérapeutique [27].

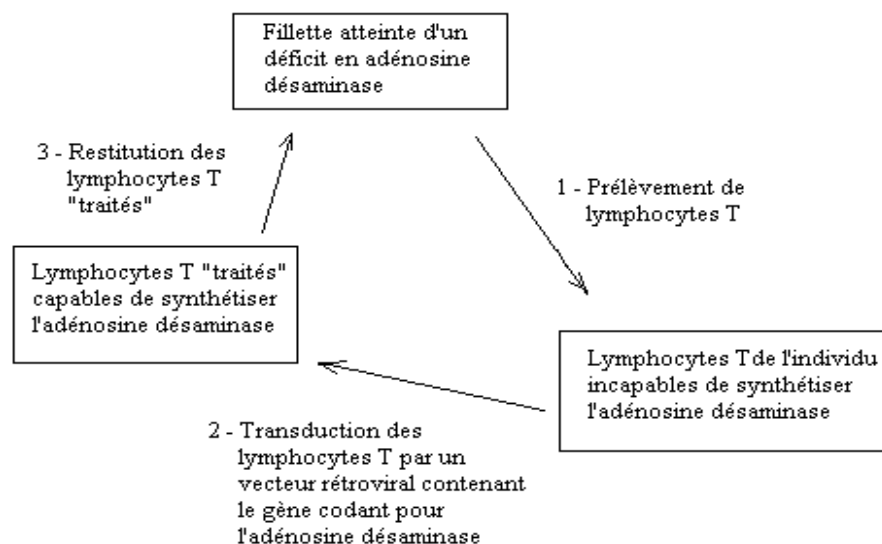
1 – Historique

a – Les débuts de la thérapie génique

Le concept de thérapie génique, en tant que réparation ou modification du patrimoine génétique pour traiter une maladie, est réellement évoqué par la communauté scientifique à la fin des années 1960 [71]. Malgré la présence de ces réflexions théoriques, le niveau technologique ne permet pas encore de réaliser pratiquement ce projet. La thérapie génique est réellement née des progrès extraordinaires qu'a connus la génétique depuis les années 1970. A cette époque sont apparus les premiers outils du "génie génétique": enzymes de restriction, sondes et clonage moléculaire, grâce auxquels le génome des organismes supérieurs (les eucaryotes), y compris celui

de l'Homme, devenait enfin accessible à une analyse détaillée [44]. L'amélioration des connaissances concernant les liens entre certains gènes mutés et certaines maladies, la création de systèmes de transfert de gènes à partir de virus sécurisés, l'amélioration des technologies de manipulation de l'ADN (toutes ces avancées sont aujourd'hui regroupées sous le terme de biotechnologie) ont permis la réalisation du premier essai clinique (figure 1) initié par S.Rosenberg, F.Anderson et M.Blaese, aux USA, à la fin des années 1980: un essai de thérapie génique sur une petite Américaine de quatre ans, atteinte d'une maladie génétique qui provoquait un effondrement total de ses défenses immunitaires. Cette déficience, due à l'absence d'une enzyme, l'adénosine désaminase ou ADA, nécessitait le maintien de l'enfant dans un environnement totalement stérile, en attendant une greffe de moelle ou, comme ce fut le cas, une greffe génétique. Cette petite fille reçut une greffe de ses propres lymphocytes T dans lesquels avait été introduit le gène permettant de produire l'enzyme dont elle était dépourvue. La modification génétique de ses lymphocytes fut effectuée au moyen d'un vecteur rétroviral exprimant le gène ADA. Le fait d'injecter à la fillette ses propres lymphocytes T a permis d'écarter les soucis de rejets de greffe. Cependant, l'expression du gène transféré s'est montrée très fugace, et des injections répétées étaient nécessaires.

Figure 1: Principe du premier essai de thérapie génique (1989) sur une patiente atteinte de déficit immunitaire par absence d'expression de l'adénosine désaminase (ADA) par les lymphocytes T.



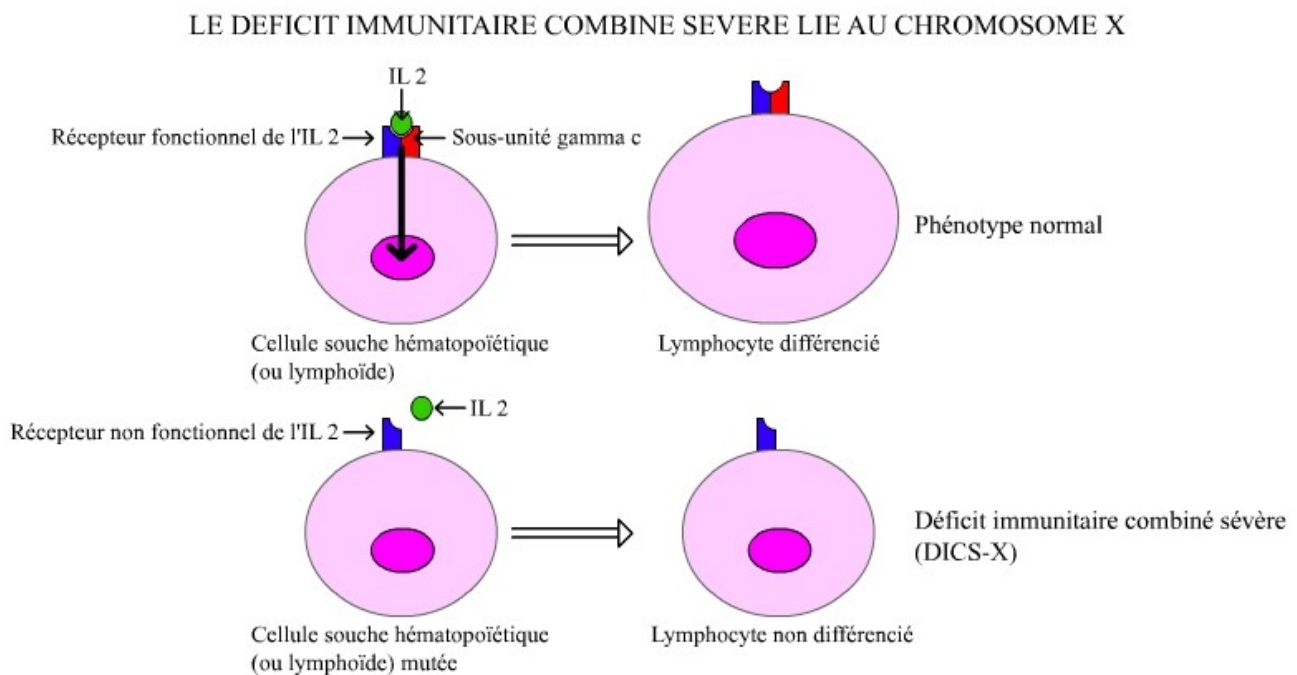
Cette percée a permis le développement d'une kyrielle d'essais cliniques dès les années 1990 pour des maladies aussi diverses que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les infections virales, les immunodéficiences héréditaires... [57, 5]. Ces approches innovantes sont apparues alors comme une nouvelle étape fondamentale dans l'histoire de la médecine. En effet, elles permettaient d'envisager de traiter directement les causes de la maladie plutôt que de s'attaquer seulement aux symptômes.

Ces avancées se sont associées à un engouement majeur du public et des investisseurs pour les biotechnologies au début du XXI^e siècle, notamment grâce au Téléthon. Néanmoins, face à des industriels et des patients avides de résultats positifs immédiats, et desservie par une communication faisant peu la part des choses entre la réalité du terrain et les hypothèses, la thérapie génique s'est rapidement confrontée à un constat d'échec; en effet, aucun bénéfice réel n'a été observé pour les quelques 4000 patients jusque là enrôlés dans les essais. Cela a inévitablement conduit les capitaux-risqueurs à se désengager du projet et la thérapie génique a du amorcer son entrée dans le XXI^e siècle accompagnée de la méfiance de beaucoup concernant son réel potentiel en génétique médicale.

b – La première réussite

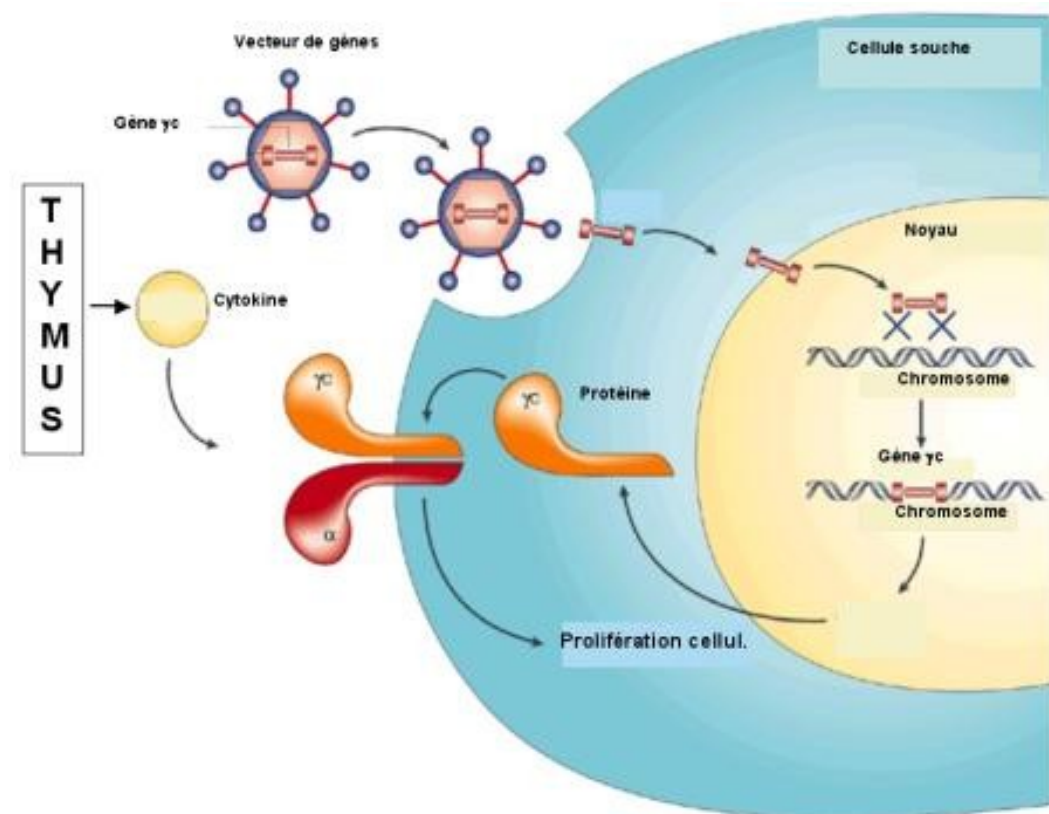
C'est en décembre 1999 qu'est survenu le premier succès probant, par l'équipe du professeur Alain Fisher de l'unité INSERM U429 de l'hôpital Necker à Paris, sur des enfants atteints d'un déficit immunitaire grave [27]. Ces "enfants bulles", c'est-à-dire touchés par le "déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X" (DICS), ne devaient être en contact avec le moindre antigène car leur organisme était incapable de résister aux infections, mêmes légères, dues aux divers agents pathogènes, bactéries et virus, présents dans l'environnement normal; c'est pourquoi ils étaient confinés dans des enceintes hospitalières sous atmosphère stérile. Dans cette maladie héréditaire touchant exclusivement les garçons et concernant environ un garçon sur 300 000, les lymphocytes T et les cellules NK (*Natural Killer*) ne sont pas produits car leurs cellules souches, dépourvues des récepteurs pour deux cytokines (ces récepteurs sont appelés *gamma c*, ou *yc*), sont incapables de se différencier et de se multiplier (figure 2). La maladie est létale durant la première année de vie en l'absence de greffe de moelle osseuse allogénique [25].

Figure 2: Origine du déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DISC-X). La sous-unité gamma-c intervient dans la constitution de différents récepteurs aux interleukines (IL2, 4, 7, 9 et 15). La mutation du gène codant pour cette sous-unité empêche la mise en place de ces récepteurs. L'absence de récepteur fonctionnel pour l'IL2 a pour conséquence une absence de différenciation des cellules souches lymphoïdes en lymphocytes, la transduction du signal ne pouvant s'effectuer. D'après IBARRANDO Françoise, site internet www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/therapie_genique.



Le DICS lié à l’X réunissait une série de facteurs favorables à la réussite de la thérapie génique: ciblage possible de précurseurs hématopoïétiques, capacité d’expansion considérable des précurseurs transduits et, enfin, longue durée de vie des lymphocytes T ainsi produits. Dix patients ont été traités par transfert *ex vivo* du gène γc dans leurs précurseurs médullaires CD34⁺ à l’aide d’un vecteur rétroviral de souris MFG (dérivé du virus Moloney de la leucémie, MoMuLV) défectueux pour la réplication (figure 3). Une fois modifiées, les cellules souches ont été réinjectées aux patients par voie sanguine. Une correction stable du déficit immunitaire a été obtenue chez neuf d’entre eux, les enfants se développant et vivant normalement dans un environnement non protégé.

Figure 3: Principe de la thérapie génique appliquée aux patients atteints de DICS lié à l’X. Le vecteur rétroviral permet la transduction du gène codant pour le récepteur gamma c dans le génome du lymphocyte. Celui-ci synthétisera alors la protéine gamma c, permettant la fixation des cytokines à la surface de la cellule. D’après le site internet www.gensuisse.ch.



L’efficacité de ce traitement a été confirmée par une équipe britannique chez quatre autres patients, et rapportée par l’équipe de C. Bordignon à Milan (Italie) pour une autre forme de DICS, le déficit en adénosine désaminase (ADA) [5]. L’ensemble de ces résultats a permis d’envisager un développement de cette thérapeutique pour la prise en charge des maladies héréditaires graves du système immunitaire, à chaque fois qu’un avantage sélectif pouvait être conféré aux cellules transduites: c’est le cas d’autres formes de DICS, ainsi que du syndrome de Wiskott-Aldrich. Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est un déficit immunitaire héréditaire rare (un cas sur 200 000 naissances) de transmission récessive liée au chromosome X. Ce déficit se manifeste chez le jeune garçon, tôt dans l’enfance, par des signes hémorragiques (purpura, pétéchies, ecchymoses, épistaxis, diarrhées sanglantes ou autres), des infections récidivantes (bronchiques, pulmonaires...), un eczéma et parfois des signes d’auto-immunité. L’étude hématologique met en évidence une thrombocytopénie sévère, souvent inférieure à 50 000 plaquettes, ainsi que des plaquettes de petite

taille (4 à 5 microns). La prise en charge des enfants atteints de WAS consiste à traiter et prévenir les infections. Lorsqu'elle est très sévère, la thrombopénie peut être améliorée par la splénectomie, seule la greffe de moelle osseuse permet de guérir cette maladie. L'identification du gène responsable du WAS permet d'effectuer un diagnostic anténatal précoce, sur biopsie de trophoblaste à 11 semaines d'aménorrhée, lorsque la mutation dans la famille à risque est identifiée. Dans les formes familiales (plus d'un sujet atteint) il est également possible d'utiliser les marqueurs polymorphes liés au locus de la maladie afin d'évaluer le risque pour une femme d'être conductrice ou pour réaliser un diagnostic anténatal au même terme [38].

La survenue d'une complication sévère de la thérapie génique chez deux des enfants traités pour DICS lié à l'X a néanmoins soulevé la question des risques inhérents à cette approche. Près de trois ans après le traitement, deux enfants - les plus jeunes au moment du traitement - ont développé une prolifération clonale de lymphocytes T différenciés, ou leucémie. Ces cellules partageaient certaines caractéristiques avec des cellules leucémiques - aspect blastique, croissance rapide, clonalité et anomalies génétiques secondaires, mais présentaient aussi quelques propriétés les distinguant - caractère différencié, présence de trois clones anormaux chez un patient et phénotype cytologique et cytogénétique variable chez l'autre [51]. La survenue de ces complications a nécessité la mise en place d'un traitement par chimiothérapie chez les enfants, suivi d'une allogreffe de moelle osseuse. Une rémission complète a aisément été obtenue chez l'un d'eux, alors que le deuxième patient est décédé de ces complications. Plus tard, courant janvier 2005, une nouvelle complication sur un troisième patient a conduit l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) à interrompre ces essais. Les recherches ont montré que ces intégrations avaient eu lieu près du site fragile FRA11E, connu pour son intervention dans l'apparition de tumeurs. De plus amples analyses ont montré que la présence de ces sites dans l'ADN augmentait la fréquence de survenue des intégrations inadéquates [39, 51].

2 – Les aspects techniques de la thérapie génique [27, 8]

a – Définition

Deux techniques thérapeutiques correspondent au terme de thérapie génique: la réparation d'un ou plusieurs gènes et l'utilisation de gènes comme médicaments. La plupart des essais cliniques et travaux réalisés jusque là concernent cette deuxième approche. Ce n'est que très récemment que la correction *in situ* des gènes a été envisagée pour des maladies génétiques dues à des mutations ponctuelles.

Avec la thérapie génique, le gène est devenu un médicament pour les cancers et les maladies infectieuses. La thérapie génique peut également s'appliquer, évidemment, à des maladies génétiques et, plus généralement, à toutes les affections, héréditaires ou acquises, qui peuvent bénéficier du traitement par une protéine thérapeutique. En effet, il est en principe toujours possible de remplacer un médicament protéique par le gène qui va en commander la synthèse dans les propres cellules du malade qu'il faut soigner (figures 4 et 5).

Figure 4: Etapes cellulaires menant à l'expression d'un gène.

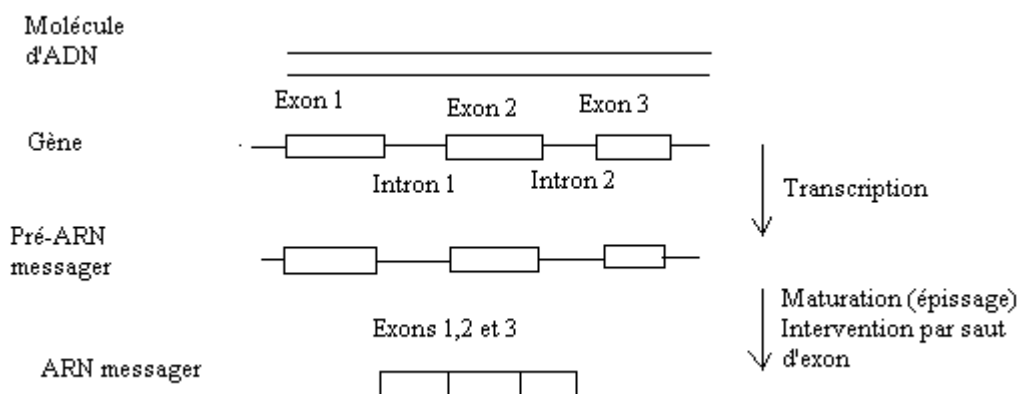
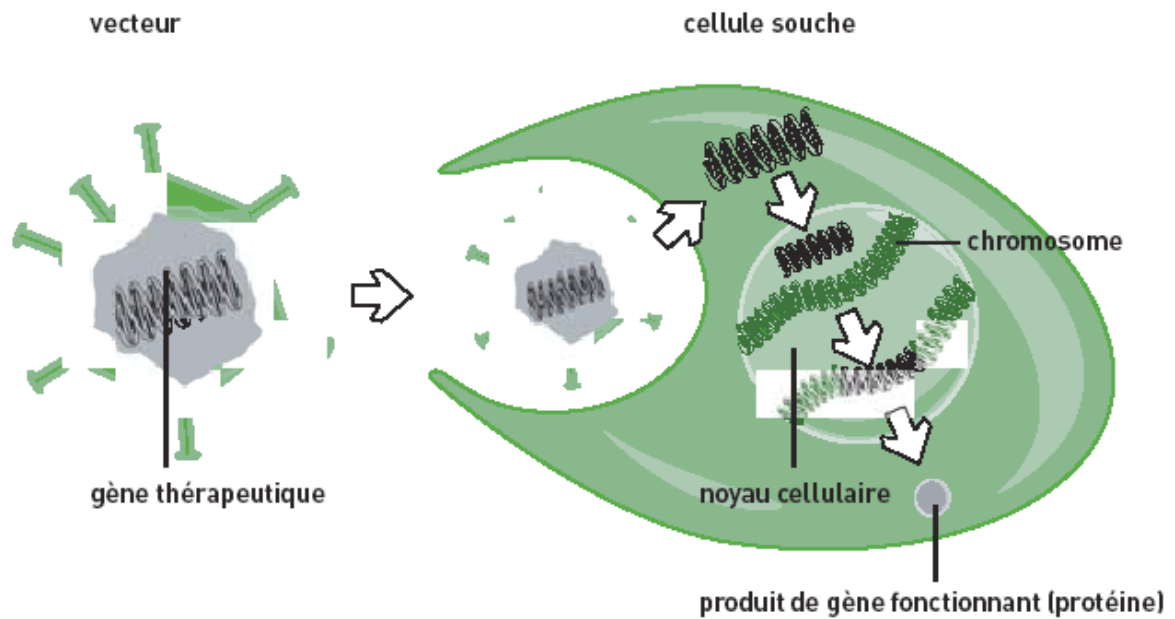


Figure 5: Principe de la thérapie génique : le gène thérapeutique est introduit à l'aide d'un vecteur dans le génome d'une cellule souche défectueuse. Celle-ci se met alors à synthétiser une protéine qui va rétablir la fonction qui faisait défaut dans l'organisme ou inhiber, voire supprimer, une fonction « perturbatrice ». D'après le site internet www.ethique.inserm.fr.



b – Thérapie génique somatique ou germinale ?

Dans cette étude ne sera abordée que la thérapie génique somatique, où il s'agit de traiter un malade par un médicament qui est ici un gène, ou encore de corriger la mutation d'un gène dans le tissu atteint, sans modifier d'aucune manière l'hérédité de ce malade. Cette thérapie génique somatique s'oppose à la thérapie génique germinale, où le nouveau gène se retrouve dans toutes les cellules de l'organisme, notamment dans les gamètes ; il sera donc transmissible à la descendance comme un nouveau caractère génétique. La thérapie génique germinale n'est réalisée à ce jour que chez l'animal. Par transfert d'un gène thérapeutique dans des embryons unicellulaires, celui-ci se retrouve dans toutes les cellules de l'organisme issu de cet embryon, notamment dans les gamètes, et il sera donc transmis à la descendance comme un nouveau caractère génétique. Une telle méthode n'aurait, dans l'immense majorité des cas, pas d'indication thérapeutique chez l'Homme. En effet, il faudrait, pour ce faire, disposer des embryons unicellulaires, tels qu'ils sont obtenus aujourd'hui, en plusieurs exemplaires, par fécondation *in vitro*. Ensuite, dans le cas d'un couple risquant d'avoir un enfant atteint, il faudrait faire un diagnostic des embryons normaux et de ceux possédant l'anomalie, grâce à des méthodes réunies sous le terme de « diagnostic pré-implantatoire ». Cependant, la réalisation d'un tel diagnostic conduirait évidemment à écarter les embryons destinés à donner naissance à un enfant malade et à ne transférer dans l'utérus maternel que les embryons indemnes, c'est-à-dire aboutirait à un tri d'embryons et non pas à une tentative incertaine de

thérapie génique. Le débat sur la légitimité éventuelle de la thérapie génique germinale est constant parmi les scientifiques. En l'absence d'indication thérapeutique réelle à ce jour, il apparaît que ce terme recouvre plus « l'amélioration génétique » que le traitement germinal d'une maladie, ce qui soulève naturellement de toutes autres questions morales et éthiques.

La thérapie génique somatique se rapproche beaucoup plus de toutes les autres formes de thérapeutique : il s'agit de traiter un malade par un médicament, qui est ici un gène, ou encore de corriger la mutation d'un gène dans le tissu atteint, sans modifier d'aucune manière l'hérédité de ce malade. Les seuls essais envisagés chez l'Homme, dans l'état actuel des connaissances et des techniques, concernent la thérapie génique somatique [27].

c – Les vecteurs en thérapie génique

Une fois le gène sélectionné pour son potentiel thérapeutique pour une maladie donnée – les connaissances du génome humain ou canin sont généralement suffisantes pour réaliser cette recherche – l'une des étapes cruciales de la thérapie génique est de faire pénétrer la nouvelle information génétique dans l'organisme du patient. Les systèmes de transfert de gènes doivent être à la fois sûrs, efficaces, spécifiques ou non d'un type cellulaire et capables de fonctionner dans des cellules qui ne se divisent pas en assurant la stabilité de l'expression du gène d'intérêt thérapeutique [75]. Ces systèmes de transfert, appelés vecteurs, peuvent être des particules, virales ou non, permettant d'introduire des gènes ou des fragments d'ADN dans des cellules cibles.

- Vecteurs viraux [27, 125]

Les virus sont des vecteurs naturels puisque leur propriété essentielle est de transférer du matériel génétique (ADN ou ARN) dans les cellules. La transformation d'un virus en vecteur de thérapie génique se fait par inactivation de ses gènes responsables du pouvoir pathogène et par remplacement par le gène thérapeutique; les virus sont alors dits "sécurisés", car encore capables d'assurer leur cycle viral sans conserver leur comportement pathogène. Le génome du virus est reconstruit pour porter les séquences du gène thérapeutique. Les protéines virales qui manqueraient potentiellement à la formation des particules virales thérapeutiques sont fournies par des cellules dites productrices ou d'encapsidation lors de la phase de production des vecteurs en laboratoire. Aujourd'hui, approximativement deux tiers des protocoles cliniques de thérapie génique utilisent un vecteur d'origine virale [27]. Pour la plupart d'entre eux, les vecteurs viraux sont plus efficaces que les non-viraux concernant le transfert du gène médicament, mais ils présentent des inconvénients liés à leur immunogénicité, leur pouvoir pathogène et la durée et le niveau d'expression du gène

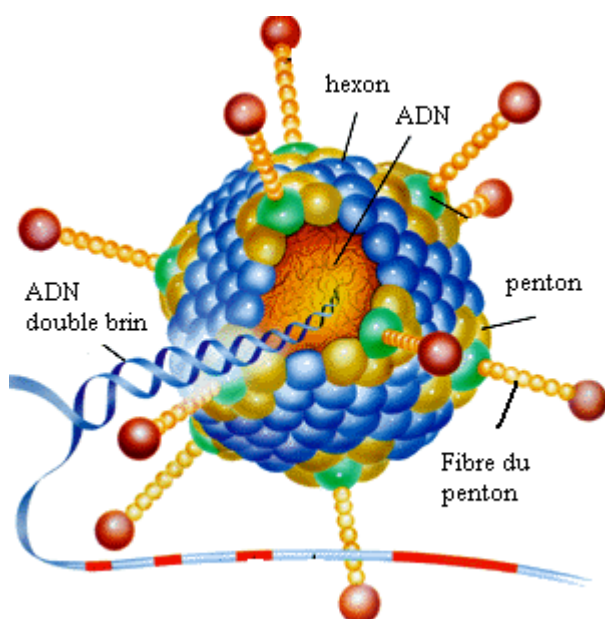
introduit [42]. Quatre types de vecteurs sont particulièrement développés, les rétrovirus, les adénovirus, les virus herpes simplex et les virus adéno-associés AAV (*adéno-associated viruses*).

- Vecteurs adénoviraux

. Morphologie et structure des adénovirus (figure 6)

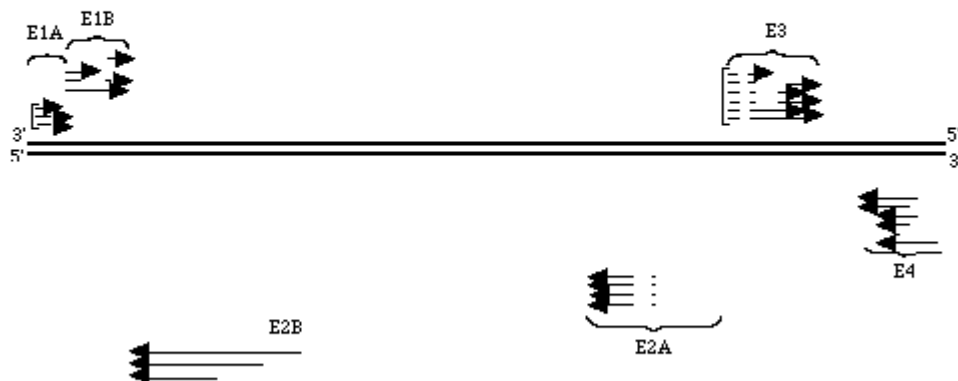
Les adénovirus sont des virus nus à ADN double brin de 30 à 35 kb. De forme icosaédrique, ils font partie de la famille des *Adenoviridae*. La capside est formée de l'assemblage de protéines, les hexons et les pentons, chaque penton étant constitué d'une base et d'une fibre.

Figure 6: Structure d'un adénovirus. D'après www.flupatrol.com.



Le génome viral (figure 7) comprend deux séquences d'ADN linéaires, bordées par deux extrémités terminales inversées. La réplication se fait par circularisation grâce à l'existence de gènes promoteurs qui initient cette phase du cycle viral. Ainsi, la suppression de ces gènes promoteurs empêche toute réplication, d'où l'intérêt des adénovirus comme vecteurs. Notons que l'on distingue une cinquantaine de sérotypes d'adénovirus différents, cette catégorisation étant fondée sur des différences structurales et fonctionnelles.

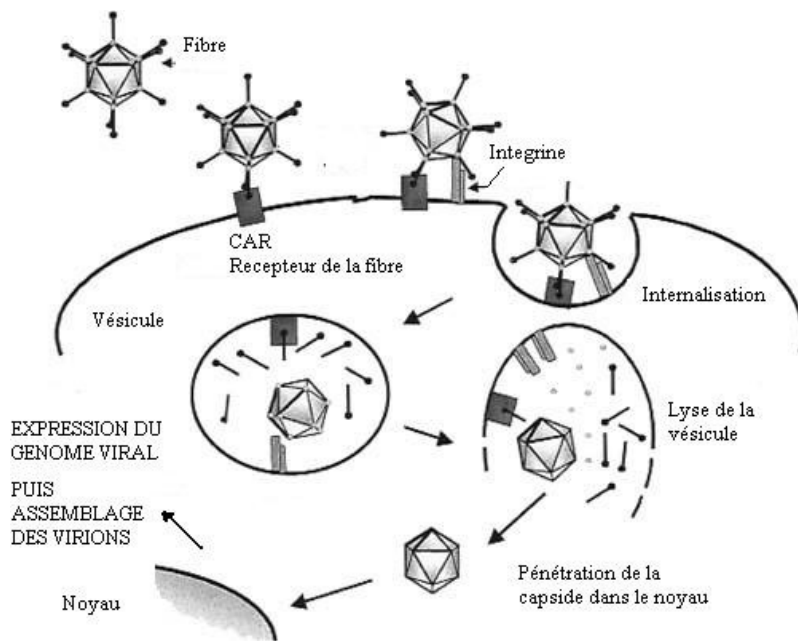
Figure 7: Génome adénoviral constitué de deux brins d'ADN – noter l'emplacement des gènes promoteurs E1, E2, E3 et E4. D'après le site internet www.tulane.edu.



. Le cycle viral des adénovirus (figure 8)

Le cycle débute par l'attachement du virus à des récepteurs cellulaires via des protéines de la capside. La fibre du penton adhère à un récepteur d'attachement spécifique nommé CAR (récepteur commun aux coxsackievirus et aux adénovirus). Ensuite, la base du penton interagit avec un récepteur de la famille des intégrines membranaires, qui entraîne l'internalisation de la particule virale dans une vésicule de clathrine. On observe alors un désassemblage séquentiel du virion, d'abord dans l'endosome puis dans le cytosol (après destruction de la vésicule de clathrine). Finalement, le virus atteint les pores nucléaires et l'ADN est importé dans le noyau où il ne s'intègre pas à l'ADN de la cellule hôte.

Figure 8: Schématisation du cycle adénoviral.



Dans le noyau, quatre gènes précoces sont tout d'abord exprimés (E1, E2, E3 et E4), codant pour des polypeptides importants pour la régulation virale et l'expression des gènes par la cellule. Les protéines codées par la région E1 permettent à la fois l'entrée de la cellule infectée dans le cycle cellulaire et le blocage de l'apoptose ; elles assurent également l'activation des promoteurs des autres régions précoces et démarrent donc le cycle viral. La transcription de la région E2, en permettant notamment la synthèse d'une ADN polymérase virale, va permettre la réplication du génome viral. Les protéines de la région E4 éteignent la synthèse protéique et favorisent l'exportation des messagers viraux vers le cytoplasme. Enfin, la région E3 est entièrement dédiée à la mise en place des systèmes d'échappement à la réponse immune de l'hôte en empêchant, en particulier, aux gènes d'histocompatibilité de classe I d'être stimulés.

Plus tard au cours du cycle viral, le promoteur tardif majeur est activé et produit des polypeptides nécessaires à l'encapsidation des particules virales. A l'issue du cycle viral, soit 30 à 40 heures après le début de l'infection, la lyse de la cellule hôte libère environ 100 000 virions.

. Les avantages des adénovirus en tant que vecteurs viraux

Les adénovirus peuvent infecter de nombreux types cellulaires différents, y compris des cellules qui ne sont pas en division. De plus, les infections par adénovirus s'identifient par des signes cliniques qui sont fonction des sérotypes certes, mais qui restent en général sans gravité chez des individus immunocompétents. La faible pathogénicité et sa capacité à infecter de nombreux types cellulaires quiescents ou non font des adénovirus de bons candidats pour développer un outil

de thérapie génique. Ce sont les sérotypes 2 et 5, dont la biologie était la plus connue, qui ont particulièrement servi au développement des générations de vecteurs adénoviraux.

La production des vecteurs à partir d'adénovirus passe par la délétion de la région E1 qui contrôle le déclenchement de la transcription et de la réplication du cycle viral. Cette opération permet à la fois la maîtrise de la réplication virale des vecteurs, mais aussi l'obtention d'une capacité de clonage effective tout en restant dans la limite d'encapsidation du génome. Les virus délétés doivent être produits dans des lignées cellulaires complémentaires (capables de fournir l'activité E1 et d'assurer leur propagation). Notons qu'il est également possible de déléter les adénovirus de la région E3, celle-ci n'étant pas indispensable à la réalisation de la réplication virale. Depuis peu, les constructions de génome viral recombinant sont réalisées dans des levures ou des bactéries par recombinaison homologue.

Les vecteurs adénoviraux délétés peuvent être produits *in vitro* à des titres élevés (jusqu'à 10^{12} particules infectieuses par mL) et sont capables de contenir des transgènes pouvant aller jusqu'à 7,5 Kb. D'autre part, le génome adénoviral s'intègre rarement dans l'ADN de l'hôte et reste sous forme épisomale, ce qui minimise les risques de mutagenèse insertionnelle. Des applications en thérapie génique *in vivo* et *ex vivo* sont envisageables avec de tels vecteurs.

. Les limites du vecteur adénoviral

Il convient tout d'abord de traiter du risque biologique, étant donné la possibilité pour le génome viral de se recombiner avec celui de la cellule complémentaire pour la région E1 *in vitro*. Les virus ainsi produits peuvent alors acquérir de nouveau la capacité de produire E1. Les particules virales produites dans une cellule hôte par ce type de virus recombinés sont alors capables de se répliquer chez l'homme ou l'animal traité. L'utilisation de nouvelles cellules complémentaires sans homologie génomique avec les adénovirus permet de régler ce problème. Cependant, le risque biologique peut aussi survenir lorsqu'une cellule est infectée *in vivo* simultanément par un adénovirus sauvage et un vecteur adénoviral recombinant : par complémentation *in vivo*, le recombinant est alors capable de disséminer ses particules virales dans l'organisme.

Un second type de limitation vient du fait que l'expression du gène viral peut induire une réaction immunitaire, responsable d'une perte d'efficacité de l'expression du gène *in vivo*. On distingue deux phases : tout d'abord un infiltrat de polynucléaires et de macrophages quelques jours après l'infection, puis l'élimination spécifique des cellules transduites. En particulier, la présentation à la surface des cellules transduites de peptides viraux (ou issus du produit du

transgène) associés aux molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est responsable de l'induction de lymphocytes T cytotoxiques. Ces lymphocytes T sont responsables de l'élimination rapide des cellules exprimant le transgène d'intérêt. Parallèlement, la présentation par les molécules de classe II du CMH de peptides viraux (ou issus du produit du transgène) est responsable de l'induction de lymphocytes T auxiliaires CD4+. Essentiellement de type Th1, ils permettent de renforcer les réponses cytotoxiques mais aident aussi à la production d'anticorps. Enfin, l'entrée du virus dans l'organisme conduit à l'activation de lymphocytes B spécifiques du virus et à la synthèse d'anticorps qui sont essentiellement des immunoglobulines G (IgG) dans le sang et des IgA dans les liquides broncho-alvéolaires. La maîtrise de l'immunogénicité du vecteur passe par le contrôle de la réaction immunitaire de l'hôte et par la modification du génome adénoviral.

Enfin, nous avons précédemment vu qu'il est impossible d'insérer des gènes de plus de 7,5 Kb par l'intermédiaire des vecteurs adénoviraux. Il n'est par conséquent pas envisageable de les utiliser pour transférer des gènes de grande taille. Une dernière limite du vecteur adénoviral concerne l'incapacité des recombinants délétés en E1 et E3 de se répliquer et de ségréger dans les cellules filles : on observe une perte progressive de ce génome dans les tissus en division, ce qui limite la durée du transfert de gènes (tout au plus 15 jours en général). A noter que des vecteurs adénoviraux permettant d'insérer des gènes allant jusqu'à 30 Kb ont été produits ; ce sont des vecteurs dits sans entrailles ou « gutless ».

. Modification du génome viral et contrôle des réponses immunitaires : tentatives d'amélioration des vecteurs adénoviraux

Pour obtenir des vecteurs efficaces, contrôler l'expression de leurs gènes et la production de virions compétents, il est possible de réaliser des délétions supplémentaires. Par exemple, des lignées cellulaires complémentaires pour E1 et E4 permettent de déléter les adénovirus de ces deux régions génomiques. Cela mène à une réduction significative de la production des protéines virales tardives et de la réponse cellulaire cytotoxique. Fondée sur le même principe, la production de virus délétés des régions E1 et d'une partie de E2 a permis de bloquer la transcription des gènes tardifs ainsi que la répllication *in vitro*. *In vivo*, ces virus restent capables de transduire efficacement les cellules et permettent l'expression durable de transgènes. De nouvelles pistes de recherche abordent l'utilisation du système de recombinaison du bactériophage P1, capable de reconnaître et d'éliminer des sites d'ADN spécifiques.

Le contrôle des réponses immunitaires anti-adénovirales, lui, est l'objet de nombreuses études et essais.

On distingue tout d'abord l'utilisation de molécules visant à provoquer une immunosuppression non spécifique chez le sujet recevant l'adénovirus. Citons entre autre le recours possible aux drogues immunosuppressives (cyclophosphamide, cyclosporine...), aux cytokines (qui favorisent la production de lymphocytes T et inhibent celle d'anticorps neutralisants).

Plus intéressantes, les mesures qui tentent d'induire des états de tolérance spécifiques aux adénovirus recombinants sont multiples. Par exemple, l'administration néonatale de ces vecteurs a permis de rendre des animaux tolérants, ce qui se traduit par une expression du transgène durable et une possibilité de réadministration efficace. Ces résultats, spectaculaires sur le plan expérimental, peuvent difficilement être étendus à une approche clinique. Une induction de tolérance peut bloquer le contrôle d'éventuelles infections par des adénovirus sauvages.

Les recherches les plus prometteuses concernent la production d'adénovirus délétés de la région E3, et plus précisément de la partie B, responsable de la synthèse des médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, prostaglandines essentiellement). De nombreux travaux ont rapporté les bénéfices apportés par cette délétion qui permet au gène transduit de persister dans l'organisme de façon plus notable.

. Utilisation des vecteurs adénoviraux en thérapie génique : synthèse et perspectives

Le vecteur adénoviral est largement utilisé dans des essais cliniques et précliniques de traitement du cancer. Une étude a suggéré que l'utilisation d'adénovirus exprimant des antigènes de tumeurs devrait générer une réponse immunitaire contre ces antigènes et permettre une thérapie immunologique des cancers. D'autres études ont utilisé des adénovirus exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex dans le but de réaliser une thérapie génique suicide des cellules cancéreuses dans le cas du mésothéliome ou du cancer de l'ovaire. La thérapie génique corrective par utilisation d'adénovirus recombinants induisant la production de la protéine p53 a permis d'induire l'apoptose des cellules tumorales p53-.

Enfin, l'adénovirus est source de nombreux espoirs concernant l'application de la thérapie génique aux maladies génétiques. La mucoviscidose par exemple est l'objet de nombreux essais en cours, le gène déficient semble en effet exprimable dans l'épithélium respiratoire suite au transfert du vecteur. Cependant, de nombreux progrès restent à faire, aussi bien sur l'expression du transgène

(sur la durée et du point de vue de son intensité) que concernant la maîtrise de la réaction immunitaire de l'hôte.

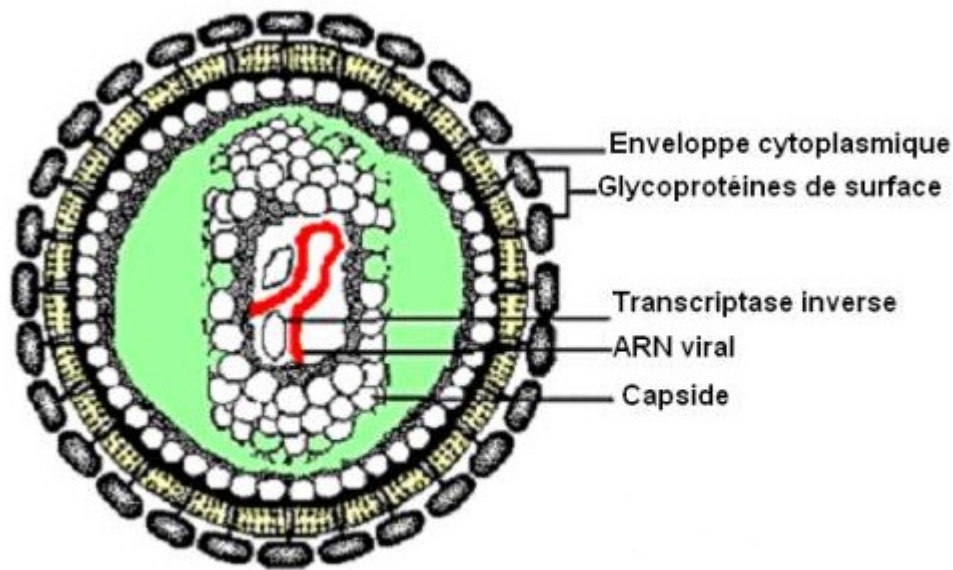
- Vecteurs rétroviraux

A l'inverse des adénovirus, les rétrovirus permettent d'insérer la nouvelle information génétique dans le génome de la cellule cible, qui sera transmise de cellules mères en cellules filles de manière égale et sans effet d'atténuation de l'information dans le temps.

. Morphologie et structure des rétrovirus (figure 9)

Les rétrovirus sont des virus enveloppés à ARN double brin, c'est-à-dire qu'ils sont composés d'une capsid qui entoure deux molécules d'ARN identiques. Leur diamètre n'excède pas 130 nm. L'enveloppe virale comporte typiquement deux glycoprotéines : SU (pour *Surface Unit*) et TM (pour Transmembranaire). Leur rôle est primordial dans la pénétration du virus dans la cellule hôte; en effet, la protéine SU s'attache à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire et TM permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. L'enveloppe virale, extérieure, est dérivée de la membrane cellulaire ; la capsid, intérieure, contient les deux copies d'ARN et des enzymes nécessaires à la réplication virale (dont la transcriptase inverse). Parmi les rétrovirus, on distingue les virus oncogènes (comme le virus leucémogène félin par exemple) des genres alpha, bêta, gamma, delta et epsilon rétrovirus, et les virus non oncogènes du genre lentivirus (tels que le virus de l'immunodéficience chez l'Homme, ou VIH) et spumavirus. Les virus oncogènes sont représentés dans de nombreuses espèces animales, et induisent des tumeurs de localisations variées. Certains induisent des maladies non néoplasiques comme des anémies ou des syndromes neurologiques.

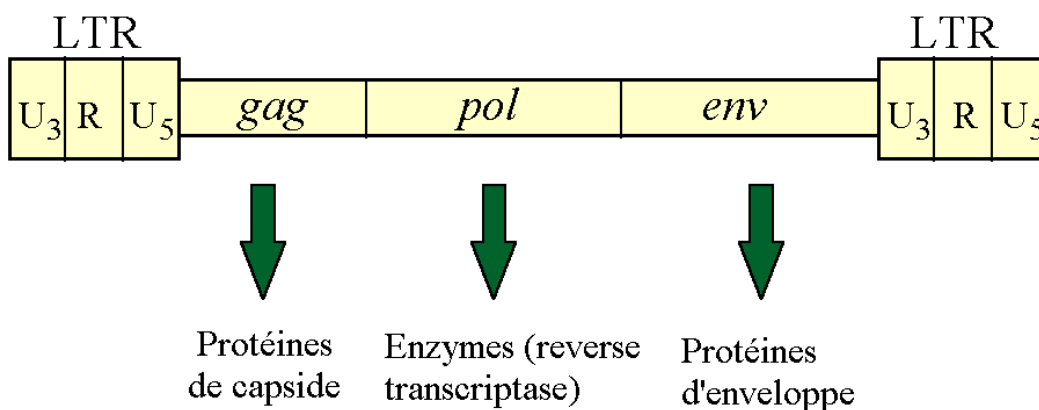
Figure 9: Structure d'un rétrovirus. D'après le site internet www.chups.jussieu.fr.



Le génome rétroviral (figure 10) est composé de deux ARN monocaténares positifs identiques longs de 4 à 10 kb, qui s'apparient de façon non covalente, au niveau de leurs extrémités 5'. Les extrémités de chaque brin comportent des séquences répétées LTR (*Long Terminal Repeat*). Entre se trouvent trois gènes :

- Le gène *gag*, qui code pour la synthèse des protéines de capsid, portant la spécificité antigénique de groupe.
- Le gène *pol*, qui permet la synthèse de l'ADN polymérase ARN dépendante en transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT)
- Le gène *env* code pour les protéines de l'enveloppe (TM et SU), participant à la spécificité antigénique de type.

Figure 10: Représentation schématique du génome rétroviral



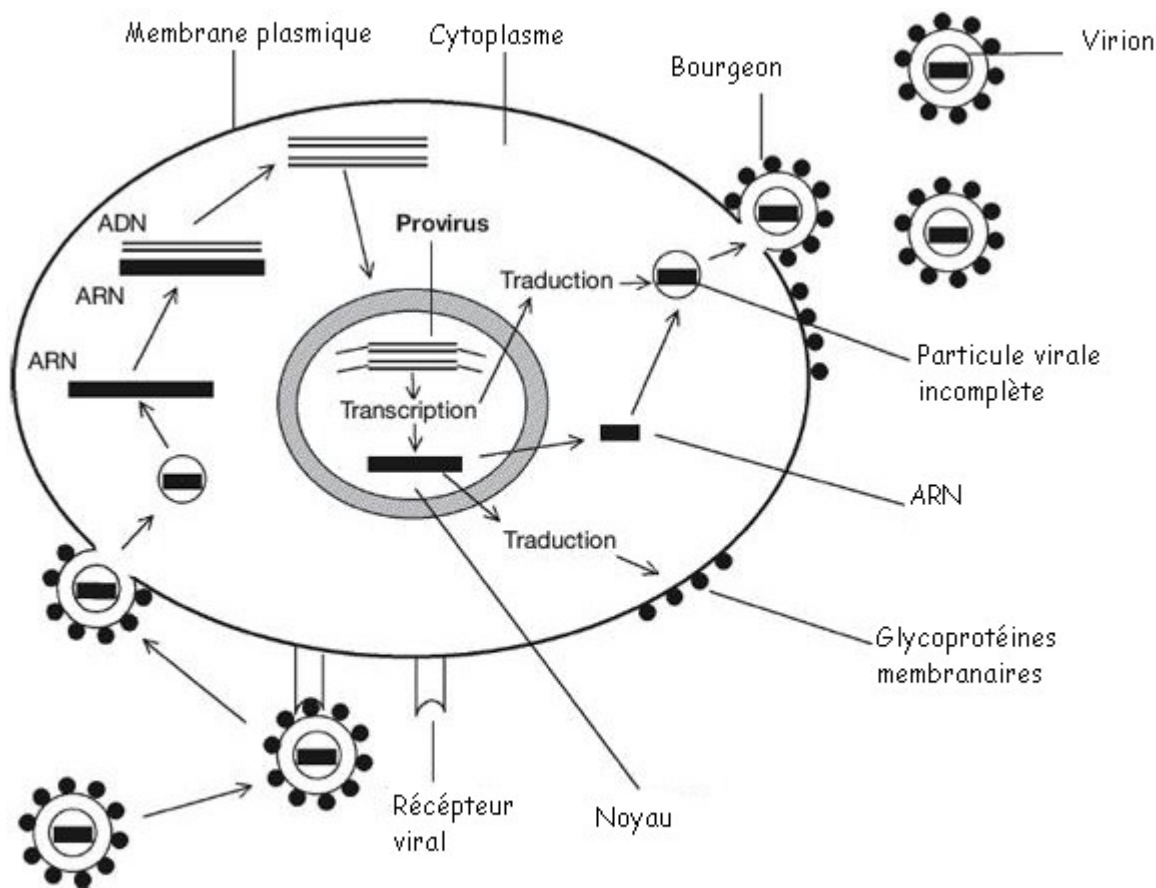
Le génome rétroviral comporte des particularités uniques : en plus d'être le seul à coder pour une reverse transcriptase à activité ARN dépendante, il n'existe pas d'autres virus dont l'ARN simple brin ne serve pas d'ARN messager (ARNm).

Autour de cette structure de base, des variations importantes sont observées chez certains rétrovirus, comme la présence d'un gène oncogène avec ou sans inactivation de gènes viraux, ou encore la présence de gènes accessoires de régulation de l'expression (cas des lentivirus par exemple).

. Le cycle rétroviral (figure 11)

Le virus s'attache à la surface de la cellule, enveloppe et membrane fusionnant (l'entrée peut rarement se faire par endocytose). Une fois la capside entrée dans la cellule, l'ARN est converti en ADN double brin par rétrotranscription. Ce dernier entre dans le noyau cellulaire par les pores, et s'intègre à l'ADN cellulaire. Les ARNm viraux sont transcrits et exportés dans le cytoplasme et permettent la synthèse des protéines virales et des nouveaux ARN génomiques viraux. A cette étape du cycle, les protéines virales de la capside s'agrègent sous la membrane cellulaire, les protéines d'enveloppe TM et SU s'y ancrent et c'est par bourgeonnement que les nouvelles particules se retrouvent en dehors de la cellule.

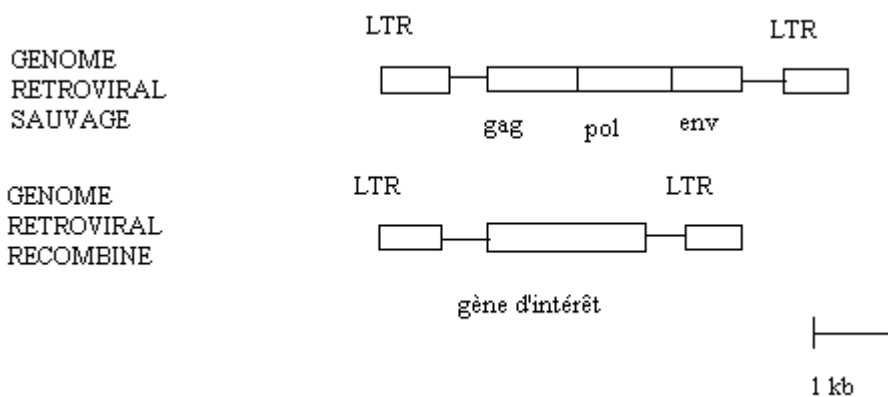
Figure 11: Cycle de réplication d'un rétrovirus. D'après le site internet www.popups.ulg.ac.be.



. Principe des vecteurs rétroviraux

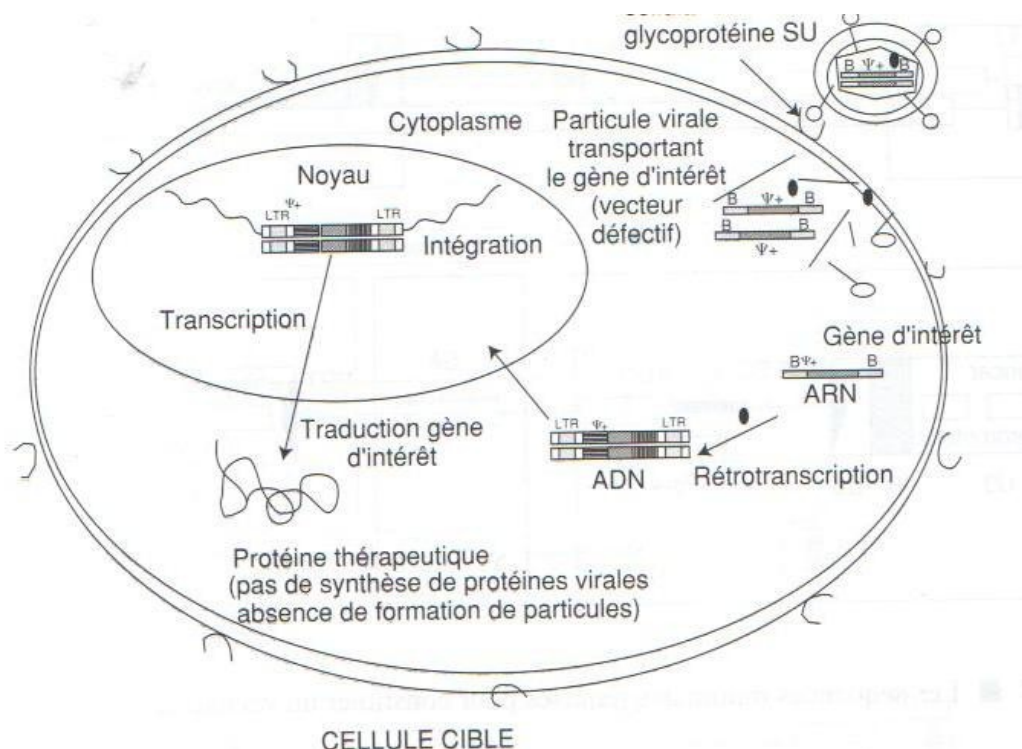
La capacité des rétrovirus à intégrer des séquences génétiques exogènes à l'intérieur du génome d'une cellule cible, a retenu l'attention des chercheurs qui ont souhaité mettre cette propriété à profit. Le développement de vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes repose donc sur la dissociation des éléments génétiques responsables de la synthèse des protéines virales et des séquences régulatrices non codantes (LTR). En effet, après formation du virion, ces dernières sont seules requises pour initier la transcription inverse, l'intégration et l'expression et doivent être présentes en cis dans le squelette viral. En revanche, les protéines et enzymes virales peuvent être complétées en trans, par un passage intermédiaire à travers une lignée dite d'encapsidation. Les cadres de lecture correspondant (*gag*, *pol* et *env*) sont alors substitués par un ou des gènes d'intérêt, désormais associés aux séquences déterminant intégration et expression (figure 12).

Figure 12: Un exemple de construction rétrovirale [27].



Après insertion des gènes d'intérêt, le vecteur est transfecté dans une lignée d'encapsidation et sera encapsidé sous forme d'ARN dans un virion infectieux, mais non propageable (figure 13). En effet, dans la cellule cible, le transgène sera seul exprimé, aucune séquence codant pour des protéines virales n'étant transmise. Ces vecteurs sont déficients pour la réplication.

Figure 13 : Cycle viral abortif d'une particule virale contenant un virus déficient véhiculant un gène d'intérêt [7].



Trois types de vecteurs rétroviraux sont développés :

-Le vecteur par substitution : le gène thérapeutique est exprimé depuis la région du promoteur LTR situé en 5'. Il a été construit essentiellement pour permettre une expression ciblée dans des cellules musculaires, des cellules de mélanome ou des cellules endothéliales. Cependant, les titres obtenus à ce jour sont très faibles et incompatibles avec des développements à visée thérapeutique directe.

-Le vecteur avec promoteur interne, qui comporte une délétion des séquences de la région U3 du LTR. Ainsi, dans la cellule cible la transcription du provirus délété et intégré démarre à partir du promoteur interne, l'ARN synthétisé ne comporte ainsi quasiment plus de séquences d'origine virale. De plus, l'excision automatique de séquences du vecteur est possible grâce à l'induction contrôlée de recombinaisons de façon à éviter que des séquences virales intégrées persistent. Le vecteur est ainsi rendu plus sûr. De plus, il est possible d'intégrer à ce type de vecteurs des promoteurs spécifiques de tissu pour faciliter une expression élevée du gène dans des tissus bien particuliers.

-Le vecteur d'orientation inversée, dans lequel une séquence génomique contenant un promoteur, des introns et un signal de polyadénylation, peut être insérée. Ici aussi, il est possible de cibler l'expression du gène d'intérêt dans des tissus spécifiques.

. Avantages et limites des vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux intègrent leur matériel dans la cellule au moment de la mitose, et ce de façon stable sans exprimer de protéines virales immunogéniques. Leurs avantages sont multiples puisqu'ils présentent non seulement une expression prolongée du gène inséré, mais engendrent, de plus, une faible immunogénicité et une haute efficacité de transduction *ex vivo*. En théorie, le vecteur rétroviral intégré devrait pouvoir résider dans la cellule hôte jusqu'à la mort de cette dernière et continuer d'exprimer le gène d'intérêt durant ce délai. En pratique, on observe une atténuation du pouvoir d'expression du gène par la cellule infectée, au cours du temps.

Néanmoins, *in vivo*, l'inactivation par les protéines du complément de l'hôte rend cette transduction bien moins efficace et la taille du gène inséré est plus faible que pour les adénovirus (8 kb maximum, jusqu'à 30 kb pour les adénovirus). Il faut souligner les difficultés rencontrées pour produire des vecteurs rétroviraux en grand nombre, ainsi que les risques de mutations suite à une mauvaise insertion du gène. En effet, un rétrovirus défectif en trans est, sauf accident, incapable d'infecter en l'absence de complémentarité et ne peut pas propager l'infection en aval de la cellule cible. Cependant, la présence conjointe d'un virus complémentaire (helper) apporterait le cas échéant les fonctions nécessaires à sa réplication. Ainsi, lorsque deux rétrovirus infectent une

cellule en même temps, les nouveaux virions issus de cette infection peuvent être des pseudotypes. Les virions possèdent le génome de l'un des virus et les protéines de l'autre. Ce risque de recombinaisons moléculaires est pris en compte lors de la production de vecteurs rétroviraux et durant la transduction *ex vivo* des cellules, via différents tests que nous ne développerons pas ici.

Un dernier risque inhérent à l'utilisation des vecteurs rétroviraux correspond à la probabilité de mutagenèse insertionnelle : la majorité des intégrations virales se fait en dehors d'un locus génétique fonctionnel et n'a pas de conséquences visibles sur la physiologie cellulaire ; il est estimé que moins de 2% du génome humain peut être transcrit. L'intégration virale au niveau de loci impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ou dans la réparation de l'ADN pourrait induire une première mutation favorisant l'apparition d'évènements mutationnels supplémentaires aboutissant à une prolifération cellulaire dérégulée.

Les recherches actuelles se tournent vers une autre famille de rétrovirus, les lentivirus (tel que le VIH, virus de l'immunodéficience chez l'Homme), capables d'infecter des cellules n'étant pas en division cette fois-ci.

. Cas particulier des vecteurs lentiviraux

On a rapidement constaté les limitations de vecteurs rétroviraux dits « traditionnels », comme présentés ci-dessus. Ces derniers, produits à partir de lignées d'encapsidation dérivées de lignées d'origine animale, subissent une inactivation par le complément très rapide après injection systémique. L'utilisation des vecteurs rétroviraux traditionnels est donc restée limitée jusqu'ici au transfert de gènes *ex vivo*.

Les lentivirus sont des rétrovirus capables, après avoir pénétré dans le cytoplasme, d'accéder au noyau des cellules cibles, en l'absence de rupture de la membrane nucléaire. L'accomplissement du cycle infectieux ne requiert donc pas nécessairement de mitoses, point qui les différencie des oncorétrovirus incapables d'infecter les cellules qui ne prolifèrent pas, puisque le franchissement de l'enveloppe nucléaire intacte leur est impossible. La mise en évidence de ces propriétés fondamentales a conduit au développement d'une nouvelle classe de vecteurs rétroviraux permettant l'intégration et l'expression à long terme du gène ainsi transféré dans des cellules quiescentes : cellules du système nerveux central, cellules rétinienne, hépatiques et cellules souches hématopoïétiques humaines. Ces vecteurs représentent donc des outils prometteurs pour le traitement génétique d'un large éventail de maladies héréditaires ou acquises. Les cellules souches

hématopoïétiques sont en particulier à l'étude, dans la mesure où les vraies cellules souches totipotentes et capables d'autorenouvellement sont la plupart du temps en état de repos mitotique.

La récente mise au point d'une première génération de vecteurs lentiviraux concernant les immunodéficiences humaines et animales (HIV-1, HIV-2, FIV ou Feline Immunodeficiency Virus et SIV ou Simian Immunodeficiency Virus) ne doit pas faire oublier que des limitations persistent néanmoins quant à la sécurité de ces vecteurs, comme cela a été envisagé dans le cadre de l'utilisation des rétrovirus « traditionnels ».

Ainsi, les vecteurs dérivés des rétrovirus, qu'il s'agisse des oncorétrovirus « traditionnels » ou des lentivirus, offrent des options multiples pour introduire un gène de façon stable dans le génome d'une cellule cible.

- Vecteurs dérivés de l'AAV [27, 72, 125]

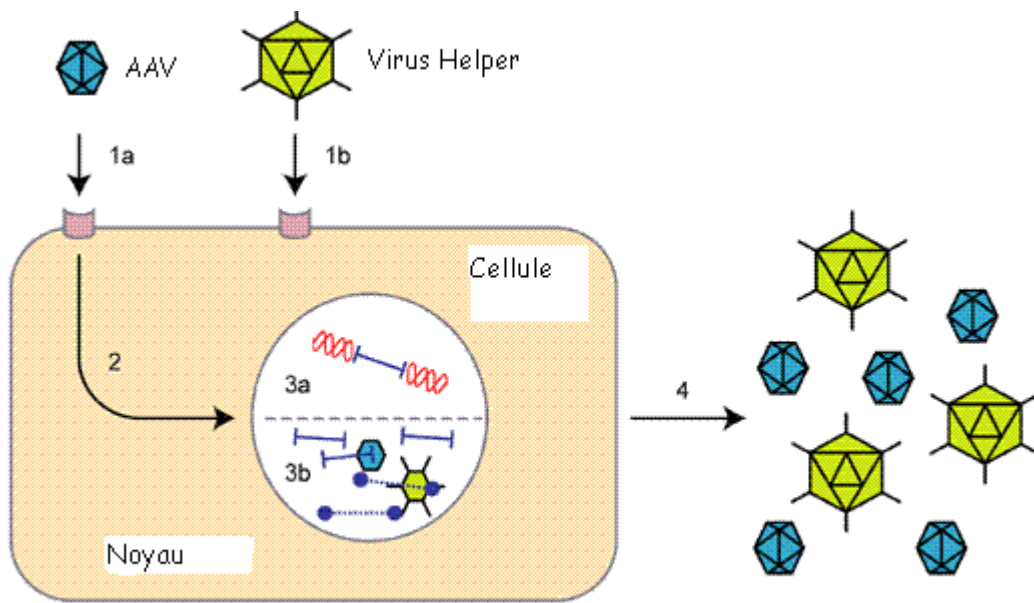
. Structure et biologie des AAV

Petit virus non enveloppé à ADN linéaire simple brin (4,7 kb), le virus adéno-associé (AAV) est non pathogène et très répandu chez l'Homme. Il fait partie de la famille des *Parvoviridae*. Naturellement déficient pour les gènes codant pour certaines protéines de réplication et de capsid, l'AAV doit être associé à un virus auxiliaire (adénovirus ou herpès virus) pour se répliquer. Ce caractère le place dans le genre des dépendovirus (figure 14).

Six souches d'AAV ont été isolées chez l'Homme ou les primates mais le virus est également présent chez de nombreux autres mammifères. La majorité de la population humaine est séropositive pour l'AAV, sans qu'une maladie soit associée néanmoins. La persistance latente du virus est asymptomatique et certaines observations épidémiologiques et moléculaires suggèrent même que l'AAV pourrait conférer une capacité antinéoplasique.

Figure 14: Cycle viral d'un AAV. (1 a et b) Attachement des virus AAV et helper à la cellule et entrée – (2) Transfert cytoplasmique – (3) Réplication dans le noyau et production des nouvelles

particules virales – (4) Libération des nouveaux virus dans le milieu extra-cellulaire. D’après www.ermm.cbcu.cam.ac.uk.

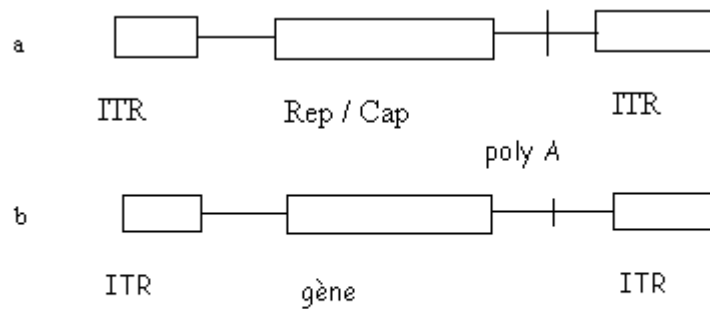


Le génome des AAV (figure 15) de 4680 nucléotides est essentiellement représenté par les gènes codant pour les protéines de réplication et de capsid, *rep* et *cap* respectivement. Le gène *rep* code pour 4 protéines de réplication et de régulation, le gène *cap* pour trois protéines structurales. De part et d’autre, on trouve les deux segments terminaux ITRs (Inverted Terminal Repeats), de 145 paires de bases chacun, nécessaires en cis à la réplication du génome et à son encapsidation.

. Production de vecteurs dérivés de l’AAV

Comme dans le cas des vecteurs rétroviraux, aucune séquence codant pour des protéines virales n’est maintenue dans les vecteurs. La production de particules recombinantes appelées rAAV est assurée par un système de complémentation dans lequel les protéines codées par *rep* et *cap* ainsi que les fonctions adénovirales auxiliaires sont apportées en *trans* pour répliquer et encapsider les génomes défectifs.

Figure 15: Génome d’un AAV et production de vecteurs dérivés d’AAV [42].



a - Structure du génome d'un AAV

b - L'AAV peut être utilisé comme vecteur par insertion de gènes thérapeutiques entre les sites ITRs

Bien que des systèmes de production stables de rAAV soient décrits, la méthode de préparation la plus efficace à ce jour est fondée sur la transfection transitoire de cellules. La construction recombinante portant les deux ITR et un vecteur d'expression pour les gènes *rep* et *cap* sont introduits par transfection dans des cellules humaines. Les fonctions auxiliaires nécessaires à la formation de particules virales peuvent être apportées par un troisième plasmide portant les régions nécessaires de l'adénovirus ou de l'herpès virus.

De nombreux efforts ont été réalisés pour modifier le tropisme des vecteurs, soit en modifiant les capsides, soit en créant des particules hybrides (capsides dites chimériques ou mosaïques, faites de l'assemblage de protéines de capside de différents sérotypes viraux). En plus de ces modifications de capside, il est nécessaire de maîtriser le devenir du génome recombinant: site d'intégration, durée et niveau d'expression du gène. Cet aspect, non moins essentiel dans le succès d'une thérapie génique, est limité par la faible capacité de stockage génomique des rAAV (5 kb tout au plus).

. Avantages et limites des vecteurs dérivés de l'AAV

Différentes propriétés des AAV les rendent très attractifs pour servir de vecteur de transfert des gènes. Outre leur innocuité, ils possèdent un large spectre de cellules hôtes et la capacité de pouvoir infecter celles-ci quel que soit leur état du cycle. De plus, le génome viral s'intègre dans le génome hôte en un site spécifique où il est maintenu à l'état latent. Enfin, les particules virales sont résistantes à des conditions extrêmes ce qui permet une manipulation plus aisée.

Bien que difficilement utilisables pour le transfert de gènes à tous les types cellulaires, les AAV semblent être très efficaces dans le transfert de l'ADN dans le muscle, le foie et le système nerveux central où ils entraînent peu de réactions immunitaires ou inflammatoires. Dans ces

organes, on obtient une expression stable du gène transféré, et ce indépendamment de la présence d'un herpès virus ou d'un adénovirus. Il faut cependant souligner que les vecteurs dérivés d'AAV ne permettent le transfert que de petits fragments génomiques (4,5 kb) de façon peu répétée et il existe un risque de mutagenèse suite à une insertion dans une région non désirée.

. Perspectives : les vecteurs rAAV, une option réaliste pour la réparation des gènes chez l'Homme

Un certain nombre d'éléments techniques sont déjà maîtrisés à l'heure actuelle :

- Choix du promoteur : constitutif, spécifique d'un tissu ou régulable
- La conception d'un nouvel AAV recombinant (rAAV) en utilisant un sérotype ITR particulier (ITR 5) permet d'augmenter l'efficacité du transfert des gènes thérapeutiques
- Des vecteurs bicistroniques permettent l'expression simultanée de plusieurs gènes à partir d'un seul ARNm
- L'incorporation d'éléments régulateurs post-transcriptionnels permet augmenter l'expression du vecteur rAAV
- Les vecteurs rAAV peuvent également distribuer efficacement de petites molécules d'ARN dans les tissus

Cependant, des progrès restent encore à accomplir, en particulier dans les domaines suivants :

- Une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'entretien des rAAV et leur capacité d'intégration
- Produire des rAAV intégrant des sites spécifiques

Récemment, les vecteurs rAAV ont fait leurs preuves concernant leur faculté à pouvoir servir dans la correction des gènes. Ils permettent en effet une modification génique au niveau de la localisation exacte du gène d'intérêt. Le principe de transfert de gène par vecteur rAAV a été validé *in vitro*, puisqu'il a permis la réparation de gènes déficients au moyen de la substitution d'une base. La correction du gène cible est d'autant plus efficace que la longueur de la séquence homologue

entre le vecteur et l'ADN ciblé est élevée. Plusieurs types de modifications ont été introduites par transfert de gène, incluant des substitutions de paires de bases, de petites délétions et insertions (inférieures à 25 pb), de grandes délétions et insertions (supérieures à 300 pb), ainsi que des combinaisons insertion/délétion. Une récente application a permis la correction d'un mutant du gène COL1A1 (codant pour un des polypeptides des fibres de collagène) dans des cellules souches mésenchymateuses. Bien que limitée à la culture cellulaire *in vitro*, cette technique permet d'espérer une application clinique en combinaison avec la thérapie cellulaire. Les succès thérapeutiques majeurs actuels restent limités au transfert de gène *ex vivo* pour des maladies génétiques dues à des mutations. Bien que l'application *in vivo* soit une perspective envisageable, il faudra avant cela améliorer l'efficacité des vecteurs et la compréhension des mécanismes moléculaires liés à leurs propriétés.

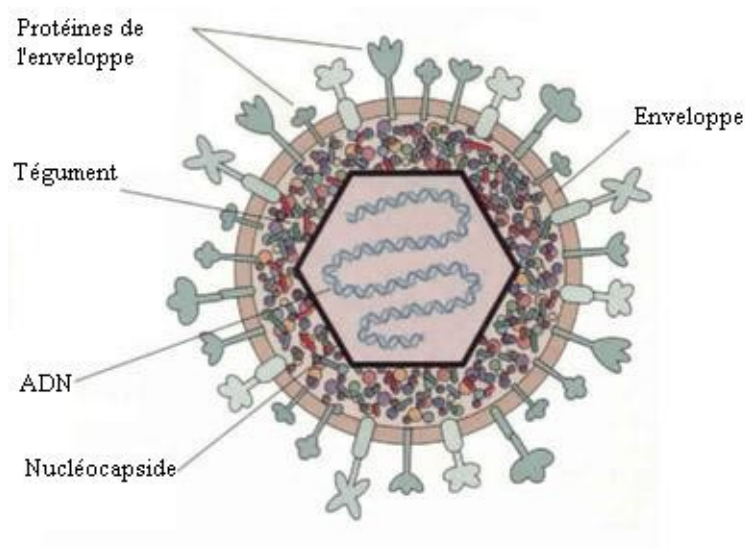
- Vecteurs dérivés du virus herpès simplex type 1

L'année 1998 aura vu le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) rejoindre la courte liste des vecteurs viraux ayant été utilisés chez l'Homme dans une finalité thérapeutique. En effet, au cours de cette année ont débuté deux essais cliniques, aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, utilisant des souches HSV-1 atténuées, pour le traitement de glioblastomes. Dans le protocole le plus avancé, à ce jour, des doses virales dépassant 10^6 particules infectieuses semblaient être très bien tolérées par les patients, pourtant déjà très affaiblis par la maladie.

. Morphologie et structure de la famille des *Herpesviridae* et du HSV-1 (figure 16)

Les herpès virus sont des virus à ADN linéaire enveloppés, dont le génome possède 125 à 235 paires de bases, soit 70 à 80 gènes. Celui-ci code pour plus de 30 protéines structurales, ainsi que de nombreuses protéines régulatrices. La capside est de forme icosaédrique, et l'on retrouve une matrice amorphe dans l'espace situé entre cette capside et la membrane lipidique. L'ensemble formé par la membrane lipidique et les glycoprotéines de surface la tapissant extérieurement est appelé enveloppe.

Figure 16: Structure d'un HSV-1. D'après www.bact.wisc.edu.



Le génome HSV-1 est constitué par une molécule d'ADN double brin linéaire. Ce génome, entièrement séquencé, est composé de séquences uniques et de séquences répétées et contient près de 80 gènes qui codent pour plus d'une centaine de protéines différentes. Ce génome comporte également deux types d'éléments génétiques bien définis agissant en cis : les origines de réplication (ori) et la séquence « a » contenant les signaux de clivage et d'encapsidation du génome viral. Ces deux types de séquences se trouvent répétées plusieurs fois dans le génome viral. La double nature lytique ou latente de l'infection herpétique (voir ci-dessous) reflète la coexistence dans le génome viral de deux programmes d'expression génique alternatifs, le programme d'expression des gènes lytiques et le programme d'expression de la latence (figure 17).

Figure 17: Structure du génome viral de HSV-1 [27]. Le génome possède trois origines de réplication (ORI L et S), deux régions uniques (UL et US) contenant les gènes codant pour des ICP (phosphoprotéines transrégulatrices), chacune entourée par des séquences répétées et inversées. Les séquences entourant UL s'appellent TRL (*Long Terminal Repeat*) et IRL (*Long Initial Repeat*),

celles entourant US s'appellent IRS (*Initial Repeated Sequency*) et TRS (*Terminal Repeated Sequency*).



La forme sauvage des herpès virus est capable à la fois d'infecter une cellule en la lysant en fin de cycle, mais aussi en restant sous forme latente (la latence correspond à une modalité de persistance du virus sous une forme d'ADN qui reste extra-chromosomique mais intracellulaire) dans des cellules spécifiques. Ce ciblage cellulaire de la forme latente dépend de la sous-famille d'herpès virus concernée, mais on retrouve chez plusieurs un tropisme pour les cellules du système nerveux et les cellules lymphoïdes. Néanmoins, les herpès virus simplex (HVS) ont la faculté d'infecter, tout comme les adénovirus, une grande variété de types cellulaires dont les cellules musculaires, tumorales, pulmonaires, hépatiques et pancréatiques. Le HSV-1 fait partie de la sous-famille des alphaherpesvirinae (il en existe trois en tout) ; il peut établir sa latence généralement dans le système nerveux.

. Vecteurs neurotropes dérivés du virus HSV-1 : avantages, inconvénients et production

Plusieurs caractéristiques des virus HSV-1 en font de potentiels vecteurs efficaces pour les cellules nerveuses : d'une part, la capside peut contenir une grande molécule d'ADN allant jusqu'à 150 kb; de plus, près de la moitié du génome viral est composé par des séquences non essentielles au virus, qui peuvent être remplacées par de l'ADN exogène ; le génome viral des HSV-1 a été entièrement séquencé et sa manipulation est assez aisée. Une inoculation périphérique de souches virales atténuées compétentes pour la réplication permet de les retrouver dans le système nerveux. Le virus peut se propager dans le système nerveux en direction rétrograde et antérograde et de manière essentiellement trans-synaptique. La latence peut s'établir dans plusieurs types de neurones du système nerveux central et dans des motoneurones.

Les inconvénients majeurs, limitant l'utilisation des vecteurs HSV-1, sont essentiellement liés à sa cytotoxicité et au risque de dissémination du virus dans l'organisme, ainsi qu'à la difficulté

d'obtenir une expression spécifique, stable ou régulable du transgène. La plupart des développements récents visent à résoudre l'un ou l'autre de ces problèmes, en fonction de l'utilisation que l'on souhaite faire de ces vecteurs (oncolyse virale, expression d'un transgène d'intérêt dans le système nerveux central, expression dans les ganglions périphériques).

Deux types de vecteurs dérivent du virus HSV-1, les vecteurs recombinants et les amplicons (figure 18).

-Un vecteur recombinant est un virus dans le génome duquel on a introduit le transgène d'intérêt. Les vecteurs recombinants défectifs portent des mutations dans les gènes codant pour des protéines essentielles à l'accomplissement du cycle lytique et nécessitent une étape préalable d'amplification dans des cellules permissives complétant la fonction virale manquante. Ces vecteurs ne peuvent pas atteindre le système nerveux lors d'injection périphérique et ne peuvent pas se répandre, même de manière limitée, dans le cerveau inoculé, ce qui limite considérablement le nombre de cellules dans lesquelles le transgène pourra s'exprimer.

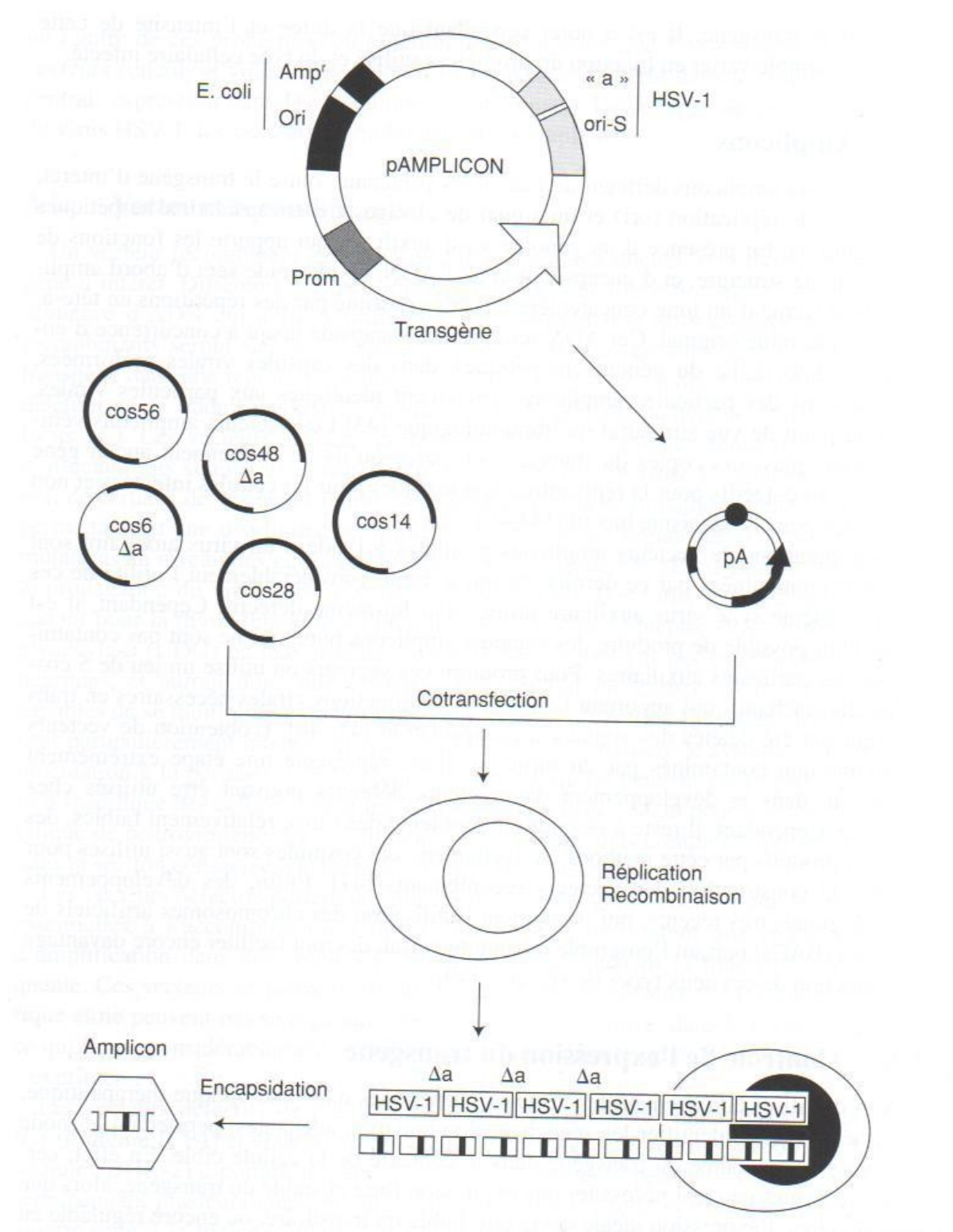
Lors du cycle lytique des HSV-1, après infection de la cellule, l'expression d'un petit nombre de gènes « précoces » (IE, pour *Immediate Early*) est induite par une protéine virale, la VP16 (*Viral Protein 16*). Les gènes IE, comprenant ICP0, 4, 6, 22 et 27 (ICP pour phosphoprotéines transrégulatrices), sont eux-mêmes régulateurs de l'expression de gènes importants pour l'induction de gènes précoces et tardifs intervenant dans la réplication et l'encapsidation.

La mutation du gène ICP4 produit un virus incapable de se répliquer excepté dans des cellules permissives, mais qui exprime toujours les autres gènes IE ; les protéines issues de l'expression de ces derniers sont toxiques pour de nombreux types cellulaires. Récemment, des vecteurs défectifs pour ICP4, 22 et 27 ont été créés, permettant de diminuer leur toxicité et de prolonger l'expression génique en culture et *in vivo*. Le développement de vecteurs défectifs pour tous les gènes IE pourrait, avec l'utilisation des cellules permissives appropriées, permettre une application clinique des vecteurs dérivés du HSV-1.

-Il existe un autre moyen de produire des vecteurs HSV au moyen des amplicons. Les vecteurs amplicons dérivent de plasmides contenant, outre le transgène d'intérêt, une origine de réplication (*ori*) et un signal de clivage et d'encapsidation herpétiques. En présence d'un génome viral auxiliaire qui apporte les fonctions de réplication, de structure, et d'encapsidation de l'ADN, ce plasmide sera d'abord amplifié sous la forme d'un long concatémère d'ADN constitué par des répétitions en tête-à-queue du plasmide original. Cet ADN sera ensuite encapsidé jusqu'à

concurrence d'environ 153 kb (taille du génome herpétique) dans des capsides virales préformées, générant ainsi des particules amplicons strictement identiques aux particules virales, tant d'un point de vue structural qu'immunologique. Les vecteurs amplicons véhiculent donc plusieurs copies du transgène et parce qu'ils ne contiennent aucun gène viral, ils sont défectifs pour la réplication, non toxiques pour les cellules infectées et non pathogènes pour l'organisme inoculé. L'inconvénient majeur des amplicons est que les titres obtenus sont très faibles.

Figure 18 : Principe des vecteurs amplicons. Un amplicon est un plasmide qui possède trois types d'éléments génétiques : (i) une origine de réplication (colE1) et un gène de sélection permettant sa propagation , (ii) une origine de réplication (ori-S) et une séquence de clivage et d'encapsidation (« a ») HSV-1 et (iii) le transgène.



La cotransfection de ce plasmide avec un jeu de 5 cosmides chevauchants, contenant l'ensemble des séquences virales sauf les séquences « a », permettra l'amplification du plasmide amplicon et du génome viral auxiliaire (ce dernier sera produit par recombinaison entre les cosmides), mais seul le concatémère amplicon sera clivé et encapsidé. D'après [22].

Vecteurs HSV-1 et thérapie génique du cancer

Les vecteurs herpétiques ont été et sont utilisés dans différents modèles de thérapie génique de maladies monogéniques affectant le système nerveux central ou des maladies neurodégénératives. Le domaine de la thérapie génique du cancer fait également partie d'une des approches les plus actuelle et prometteuse de l'utilisation des vecteurs HSV. D'une manière générale, deux stratégies différentes peuvent être développées en thérapie génique des cancers en utilisant des virus : la première et la plus développée de nos jours utilise des vecteurs défectifs et non pathogènes qui portent un transgène permettant l'élimination de la cellule cancéreuse. Cette élimination peut être obtenue, soit par guérison de la cellule, en utilisant des transgènes inducteurs de la différenciation cellulaires ou des antioncogènes, soit par élimination de la cellule, en introduisant des gènes conférant une sensibilité à une drogue, des gènes inducteurs de l'apoptose, ou des gènes inducteurs d'une réponse immune spécifique de la cellule maligne. Actuellement, de nombreuses équipes s'intéressent également à cette stratégie, en utilisant des vecteurs herpétiques, recombinants ou amplicons. La deuxième stratégie implique l'utilisation des vecteurs herpétiques compétents pour la réplication, et semble être une stratégie antitumorale très puissante, permettant l'oncolyse directe de la tumeur. Le ciblage des cellules malignes peut théoriquement être atteint, soit par la pénétration sélective du virus, soit par l'expression sélective du virus, ou encore par la réplication sélective du virus.

- Vecteurs chimériques

Une des perspectives de développement en matière de vecteurs pour la thérapie génique est la génération des vecteurs chimériques, qui présentent les avantages cumulés de deux virus ou plus. Ces travaux témoignent de l'inexistence parfois problématique d'un vecteur viral universel qui réussirait à combiner les avantages de chacun pris individuellement. Par exemple, un HSV ou un adénovirus pourraient être utilisés pour délivrer un AAV à des cellules dans lesquelles l'expression temporaire du gène *rep* permettrait l'intégration, en un site spécifique du vecteur AAV. Sur ce même principe, un gène de taille importante peut être inséré dans un AAV. Ou encore, on peut envisager insérer dans un vecteur adénoviral recombinant à la fois l'origine de réplication et la protéine E1 (intervenant dans le réplication également) provenant du papillomavirus humain ; ainsi, après infection, le génome épisomal perdure grâce aux séquences du papillomavirus. De façon similaire, des vecteurs HSV ou adénoviraux peuvent être utilisés pour délivrer des virus à ARN dont les gènes codant pour leur capside virulente ont été délétés ; ces virus pourraient alors toujours répliquer leur ARN dans le cytoplasme, permettant d'obtenir une grande production de protéines.

De nombreux protocoles de thérapie génique vont requérir l'inoculation directe de vecteurs rétroviraux chez le patient plutôt que le traitement *ex vivo* de leurs cellules. Cependant, de par leur relative instabilité et parce qu'*in vivo* la plupart des types cellulaires se divisent trop rarement, les vecteurs rétroviraux ne sont pas adaptés pour de telles applications. L'utilisation de vecteurs hybrides, ou chimériques, pourrait permettre de surmonter ces problèmes car, inoculés localement *in vivo*, ils autoriseraient la production de vecteurs rétroviraux à partir des cellules du patient lui-même. Ainsi, la sécrétion et l'infection des vecteurs rétroviraux seraient optimisés. De plus, une telle stratégie pourrait s'avérer plus satisfaisante sur le plan de la bio-sécurité. En effet, il n'est pas toujours facile de prouver que les cellules productrices de vecteurs rétroviraux sont indemnes de pathogènes ou contaminants divers. En particulier pour les vecteurs hybrides adénovirus/rétrovirus, ces divers inconvénients pourraient être surmontés car la purification des vecteurs adénoviraux permet de parfaitement séparer la plupart des contaminants issus des techniques de culture cellulaire.

Ainsi, malgré de nombreux problèmes qui restent encore à surmonter, les vecteurs chimériques comme HSV/rétrovirus ou adénovirus/rétrovirus représentent des systèmes prometteurs pour l'avenir de la thérapie génique.

Les caractéristiques des différents vecteurs viraux étudiés ici sont rassemblées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux les plus utilisés actuellement en thérapie génique.

	Rétrovirus	Adénovirus	Herpesvirus	Virus associés aux adénovirus
Immunogénicité	non	grande	Grande	non
Intégration	oui	non	Non	oui
Risque d'altération génomique	oui	non	Non	oui
Expression à long terme	oui	non	Oui	oui
Infection des cellules quiescentes	non	oui	Oui	oui
Progression rétrograde le long des axones	non	non	Oui	non

- Vecteurs non viraux cationiques [27]

- Principe et nécessité

L'un des principaux obstacles rencontrés par les vecteurs viraux est la réponse immunitaire de l'organisme, ce qui explique que la recherche se soit penchée sur le développement de vecteurs synthétiques. Cependant, faire pénétrer l'ADN dans une cellule n'est qu'une facette du transfert, puisque le complexe ADN/vecteur doit préalablement accéder à la cellule cible en faisant face aux barrières de l'organisme face à une substance exogène. Il faudra que les vecteurs produits pallient à ces problèmes. Un avantage non négligeable des vecteurs non viraux est qu'ils permettent de transférer autre chose que du matériel génétique (ADN, ARN), tels que des réactifs anticancéreux, des anticorps.

L'ADN chargé négativement (anionique) et un lipide ou un polymère cationique s'attirent par des forces électrostatiques coopératives. Le résultat en est une diminution des répulsions internes à chaque molécule qui aboutit à une compaction réciproque en des particules de 0,005 à 0,3 micromètres contenant des dizaines de copies d'ADN. Lorsque ces agrégats ont été préparés avec un excès de charges positives, cela permet la fixation des complexes aux molécules chargées négativement présentes à la surface des cellules. On assiste alors à une endocytose. La modification de pH lors de l'arrivée de l'endosome dans le milieu intracellulaire se traduit alors par une

augmentation de la concentration ionique endosomale et une entrée massive d'eau, aboutissant à sa rupture et à la libération du matériel, transféré dans le cytoplasme.

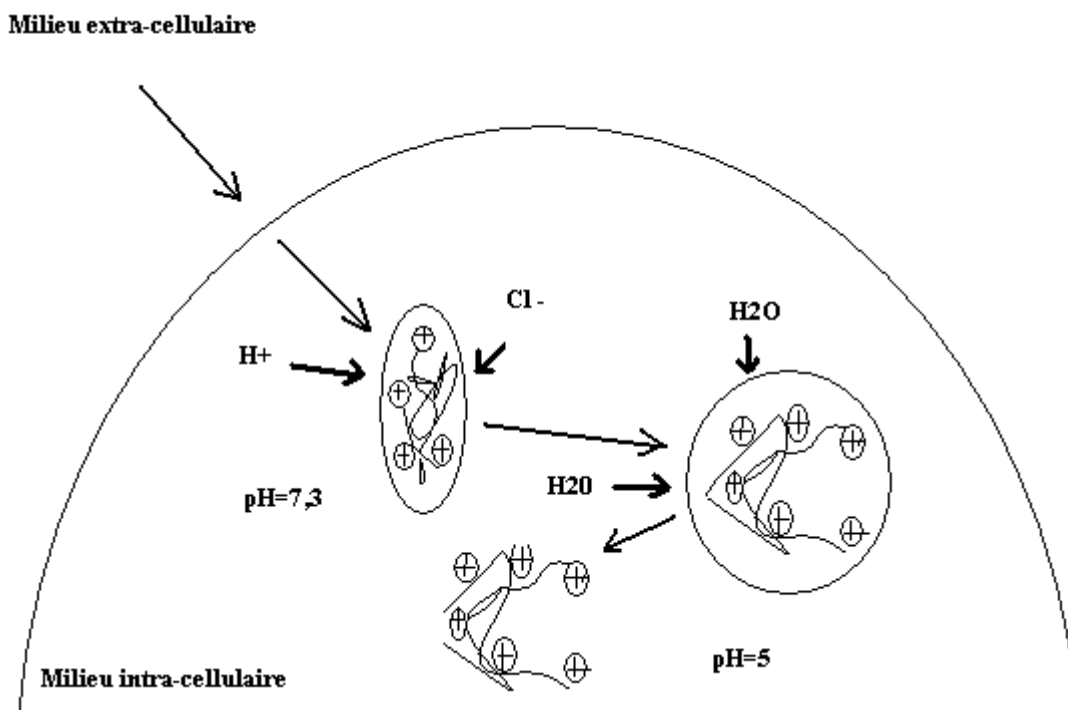
On distingue deux types de vecteurs non viraux cationiques largement utilisés de nos jours : les lipides et les polymères.

- Les liposomes polycationiques (figure 19)

Leurs capacités de condensation de l'ADN et de transfert de gènes ou de macromolécules sont connues depuis plus d'une décennie. Leur synthèse et leur commercialisation (citons la dioctadécylamidoglycyl-spermine, ou DOGS) à partir des années 90 fut une révolution dans le domaine de la thérapie génique. Depuis, plusieurs lipides cationiques présentant une efficacité de transfert améliorée et une cytotoxicité bien moindre existent. Ils offrent une protection supplémentaire contre la dégradation des molécules thérapeutiques à la fois dans le milieu extracellulaire et dans le cytoplasme. Les lipides neutres présentent une efficacité importante de relargage de l'ADN endosomal, ce qui a conduit à les utiliser dans des mixtures à base de lipides polycationiques. Il est alors possible d'obtenir une bonne distribution *in vivo*. De plus, pour mieux protéger les molécules thérapeutiques délivrées par les liposomes, l'ADN est maintenant conjugué avec des molécules cationiques. Par exemple, du sulfate de protamine est conjugué avec de l'ADN, après quoi les complexes formés sont incorporés dans des liposomes cationiques. Malgré ces progrès développés dans le domaine de la perméabilité membranaire, les liposomes cationiques simples restent les plus utilisés dans les essais cliniques actuels. C'est le cas des essais effectués au Japon sur le glioblastome, où des patients atteints ont été traités avec des liposomes cationiques contenant l'interféron bêta. De nombreux autres travaux ont également évalué le transfert de différents agents anticancéreux au moyen de liposomes chez l'Homme. C'est ainsi que ces derniers ont été considérés depuis comme sûrs dans cette espèce.

Figure 19: Séquence schématique des événements conduisant à la transfection par l'intermédiaire de vecteurs polycationiques. Suite à la complexation et à la condensation de l'ADN par le polycation, il y a interaction électrostatique avec la membrane cellulaire conduisant à l'endocytose puis à l'effet tampon du vecteur qui fixe les protons accumulés par les ATPases

vésiculaires, provoquant une augmentation de la pression osmotique qui conduit à la rupture de l'endosome et à la libération de l'ADN.



Cependant, la nécessité d'un transport du matériel jusqu'au noyau de la cellule cible pose un problème pour l'utilisation des vecteurs non viraux. Plusieurs essais ont évalué le transport nucléaire d'ADN exogène par vecteur synthétique, et il semblerait que des progrès restent à effectuer pour reproduire la capacité qu'ont les virus à introduire leur matériel au sein du noyau cellulaire. Notons enfin qu'*in vivo*, l'interaction parasite du complexe ADN/liposome avec la matrice extracellulaire lors de son trajet vers la cellule cible, mais aussi avec le système du complément, empêchent l'obtention des résultats positifs observés en culture. Cette interaction néfaste est en partie compensée par l'utilisation récente des complexes composés en partie de liposomes polycationiques.

- Les polymères cationiques

Plus anciens car utilisés pour la transfection de cellules en culture depuis 30 ans environ, on assiste depuis peu à leur emploi comme vecteurs moléculaires pour le transfert des gènes *in vivo*. C'est la polylysine qui représente le chef de file des molécules utilisées, mais pour que ses

propriétés atteignent celles des lipides polycationiques, il faut lui adjoindre des agents capables de rompre les lysosomes. Un dérivé de la polylysine, le polyéthylèneimine (PEI), une molécule extrêmement simple, obtenue par répétition d'une unité monomère $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ de 43 daltons est également utilisée. Il est capable à la fois de condenser un plasmide en des particules aussi petites que des virus, de fixer ces particules à la surface cellulaire en provoquant leur endocytose et enfin de relarguer efficacement ces particules dans le cytoplasme.

La greffe chimique de ligands sur ce vecteur de base permet d'orienter le tropisme des particules et éventuellement de modifier le routage intracellulaire de l'ADN. Par exemple, la libération et l'internalisation ciblées d'ADN dans des tumeurs peuvent être permises par des polymères polycationiques greffés de transferrine.

Des polymères biodégradables ont été utilisés pour achever la libération de l'ADN et prolonger l'expression génique, mais le PEI reste le point de départ idéal pour le développement de systèmes supramoléculaires plus sophistiqués.

En conclusion, les vecteurs non viraux polycationiques sont faciles à produire, sûrs, et induisent une faible réponse immunitaire de l'organisme. Malgré cela, le transfert du matériel reste peu efficace *in vivo* et sa durée d'expression est courte quand on la compare à celle induite par des vecteurs viraux.

- Les méthodes physiques: électroporation et ultrasons [72]

Les vecteurs non viraux permettent de délivrer de l'ADN dans des cellules cibles, comme nous venons de le voir. Parallèlement, un certain nombre de méthodes ayant pour objectif de « forcer » l'ADN à pénétrer dans les cellules ont été développées. Deux d'entre elles sont l'électroporation et les ultrasons.

- L'électroporation

L'application d'un champ électrique permet d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires afin de faciliter l'introduction de l'ADN dans les cellules. En utilisant cette méthode, on obtient une augmentation de l'expression génique jusqu'à 100 fois supérieure à celle obtenue avec de l'ADN nu. L'électroporation est une méthode populaire de transfert *in vitro*. La peau et le muscle sont les principales cibles du transfert *in vivo* et deux types d'électrodes sont utilisés, l'électrode plate et l'électrode à aiguille. L'électrode plate permet d'obtenir des résultats plus reproductibles,

mais l'électrode à aiguille est plus pratique pour le transfert de gènes dans des tissus variés. Néanmoins, l'électroporation cause des dommages tissulaires quand les courants électriques appliqués sont trop importants. Afin de résoudre ce problème, on a maintenant recours à des voltages plus réduits, l'efficacité du transfert n'étant pas affecté au vu des résultats expérimentaux.

- Les ultrasons

Plus utilisée *in vivo* qu'*in vitro*, cette méthode de transfert fait appel à la capacité des ultrasons à induire la cavitation. L'ADN est tout d'abord mis en présence de réactifs de contraste, qui sont des particules gazeuses couvertes par des lipides ou de l'albumine. En utilisant les ultrasons, les microbulles (1 à 100 micromètres de diamètre) sont rompues. L'énergie libérée permettrait d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires et donc le transfert du matériel d'intérêt. Plus la durée et la fréquence d'exposition des cellules aux ultrasons augmentent, meilleur est le transfert intracellulaire. Cependant, on observe, comme dans le cadre de l'électroporation, des dommages tissulaires à la suite des ultrasons. Il est donc essentiel de les utiliser dans les conditions optimales ; usuellement, des ultrasons de fréquence égale à 1 mégahertz sont appliqués durant 1 minute pour des cellules du tissu musculaire et 10 secondes pour du tissu d'embryon de souris. Les applications actuelles d'une telle technique physique sont les mêmes que pour l'électroporation.

- Conclusion

Les possibilités de transfert de matériel d'intérêt sont grandes et font appel, pour la plupart, aux mêmes principes généraux, que ce soit pour les vecteurs viraux, non viraux, ou encore lors de l'utilisation de méthodes physiques. Néanmoins, des problèmes spécifiques à chacun de ces outils sont rencontrés et encore aujourd'hui aucun vecteur parfait n'a été développé. Les associations de vecteurs semblent être une piste prometteuse dans la quête d'un instrument qui permettrait à la fois un transfert sûr, durable et efficace des gènes thérapeutiques.

d – Administration du vecteur

La troisième étape qui suit la réalisation d'un vecteur correspond à l'administration de ce dernier au tissu ou aux cellules cibles. Pour cela, trois stratégies existent [27]:

- La thérapie génique *ex vivo*

Utilisée dans de nombreux protocoles, elle consiste à prélever des cellules cibles de l'individu et à les confronter aux vecteurs de transfert du gène thérapeutique en dehors de l'organisme. Les cellules sont ensuite réintroduites chez le patient. Cette technique permet d'évaluer le degré de modification génétique, tant au niveau du pourcentage de cellules modifiées génétiquement par le vecteur qu'au niveau de l'expression des protéines thérapeutiques. De plus, la thérapie génique *ex vivo* est utilisée essentiellement pour présélectionner des populations cellulaires particulières, notamment les cellules souches sanguines, faciles à prélever et à réintroduire. A l'inverse, des stratégies visant à éliminer des tumeurs ou à modifier génétiquement des cellules que l'on ne peut manipuler en dehors de l'organisme nécessitent d'utiliser d'autres approches.

La nature des cellules à corriger dépend du type de maladie. Parfois, comme nous l'avons vu, l'affection à traiter impose un type cellulaire donné : les cellules souches de la moelle osseuse dans des maladies moléculaires de l'hémoglobine ou des déficits immunitaires congénitaux, les hépatocytes dans des maladies métaboliques du foie, etc. Dans d'autres cas, le produit du transgène thérapeutique est actif à distance de son lieu de production, éventuellement dans la circulation sanguine (hormones protéiques, facteurs de coagulation, enzymes lysosomales). Dans ce cas, les cellules utilisées seront celles qui sont les plus aisées à obtenir, à cultiver et qui permettent le mieux, après retransfert, une production prolongée de la protéine thérapeutique. Ont été utilisées, ainsi, des cellules endothéliales, des myoblastes, des fibroblastes, des kératinocytes... Certaines de ces cellules peuvent être réintroduites sous la forme d'un néo-organe spécialisé implanté dans la cavité péritonéale. Pour ce faire, une sorte d'éponge est constituée, comportant des fibres synthétiques inertes enduites de collagène et de facteurs de croissance, sur laquelle on ensemence des cellules génétiquement corrigées.

Une importante limitation des techniques *ex vivo* réside dans le nombre habituellement limité de cellules qu'il est possible de réimplanter après correction génétique. Cependant, la cellule réimplantée peut, du fait de la correction d'une anomalie génétique ou de l'adjonction d'un autre gène conférant un avantage sélectif naturel ou dans des conditions particulières (par exemple, résistance à un toxique), repeupler le tissu en prenant l'ascendant sur la population cellulaire résidente. Ainsi, des hépatocytes à activité normale de la FAH (fumarylacétoacétate hydrolase) peuvent repeupler à 80% un foie de souris tyrosinémique de type 1 et des lymphocytes corrigés pour l'activité de la Janus kinase 3 se développer sélectivement par rapport aux lymphocytes déficients résidents [27]. De réels espoirs existent aujourd'hui de traiter des maladies hépatiques ou

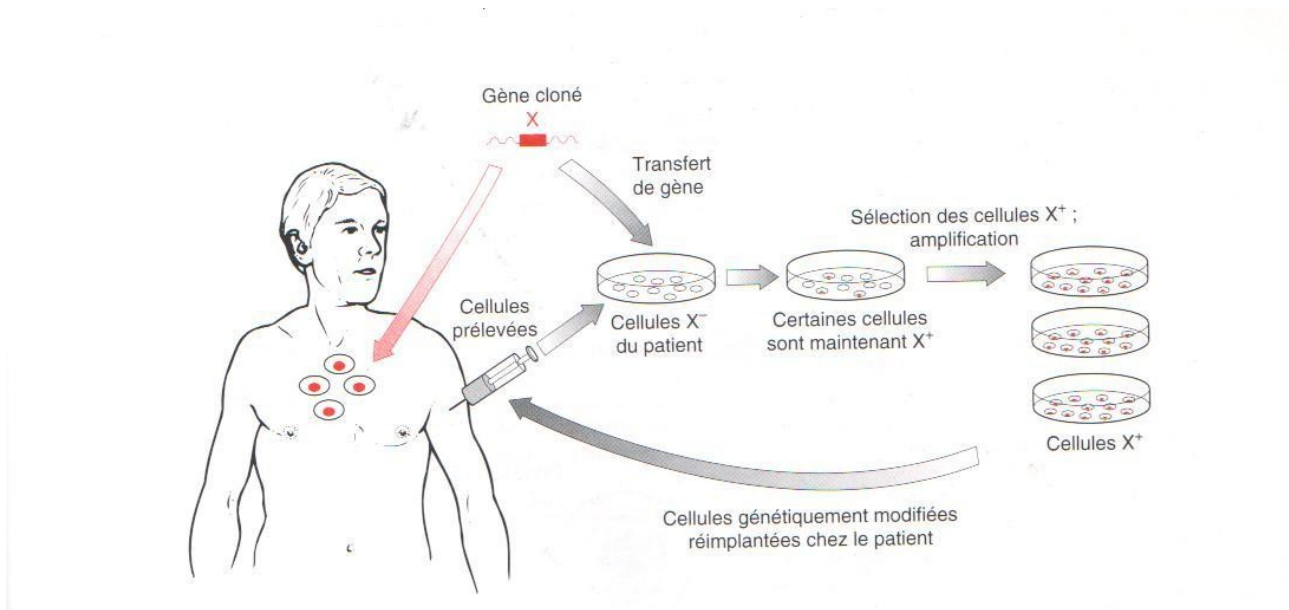
des affections pouvant bénéficier de la sécrétion dans le sang d'une protéine thérapeutique, grâce à la repopulation du foie par des hépatocytes auxquels ont été transférés le gène thérapeutique plus ou moins additionné d'un gène conférant un avantage sélectif.

- La thérapie génique *in vivo*

Parfois, la méthode précédente ne peut être utilisée car les cellules qu'il faudrait corriger ne sont pas connues ou bien ne peuvent être prélevées, cultivées, puis réimplantées, ou encore parce qu'elles sont disséminées dans tout l'organisme.

En injectant directement le vecteur portant le gène d'intérêt thérapeutique dans la circulation sanguine du patient, celui-ci doit atteindre spécifiquement les cellules cibles et agir librement. Cela pose bien sûr le problème du ciblage cellulaire par le vecteur choisi, puisque l'expression du gène d'intérêt peut, si elle s'effectue dans une partie inadéquate de l'organisme, devenir délétère (l'injection par voie sanguine d'un vecteur à l'origine de la production de facteurs d'apoptose pour des cellules tumorales doit permettre un ciblage précis ; il n'est pas envisageable de provoquer la mort de types cellulaires autres que celles étant tumorales, au risque de porter atteinte à l'intégrité de l'organisme). Les deux stratégies *in vivo* et *ex vivo* sont représentées schématiquement dans la figure 20.

Figure 20: Thérapie génique *in vivo* et thérapie génique *ex vivo* [111].



- La thérapie génique *in situ* (variante de la thérapie génique *in vivo*)

Le vecteur de transfert est ici directement injecté au sein du tissu cible. Cette technique est employée notamment dans les cas de mucoviscidose (transfert ciblé de vecteurs dans la trachée et les bronches), de cancer (injection dans la tumeur d'un vecteur portant par exemple le gène nécessaire à l'expression d'une toxine cellulaire), ou de dystrophie musculaire (injection dans le muscle d'un vecteur portant le gène codant pour la dystrophine – voir plus loin).

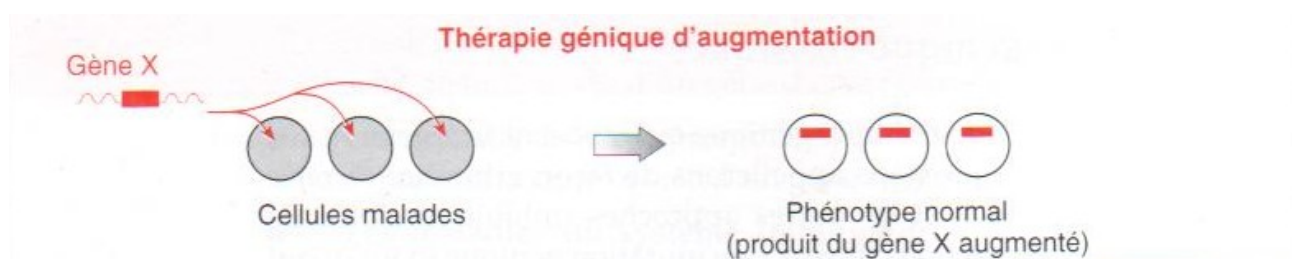
La thérapie génique *in situ* se heurte au problème de persistance de l'expression du gène d'intérêt, puisque les résultats de nombreux essais montrent qu'il y a, la plupart du temps, une atténuation de cette dernière, ce qui compromet grandement les résultats cliniques. De plus, cette technique ne permet de traiter que de petits périmètres, le vecteur restant localisé au point d'injection. Il est par conséquent impossible d'envisager traiter, par exemple, un sujet myopathe au moyen d'injections multiples. Par ailleurs, certains tissus déficients, situés en profondeur, ne sont pas accessibles aux injections. Le recours à la thérapie génique *in vivo* est prometteur de ce point de vue, puisqu'elle pourrait permettre l'atteinte homogène des cellules de l'organisme par les vecteurs.

De nombreuses perspectives de réparation de gènes ou de supplémentation protéique sont permises, compte tenu des mécanismes biologiques à l'origine des maladies et de leurs origines génétiques ou acquises. De tels travaux dépendent des capacités à mettre en place des techniques adaptées. Leur limite ne dépend que de l'imagination de la communauté scientifique et les applications possibles de la thérapie génique dépassent le seul domaine des maladies génétiques.

a – Les maladies génétiques candidates à la thérapie génique

La thérapie génique trouve tout son intérêt dans les affections dont la conséquence est une perte de fonction du gène muté. Il s'agit alors d'apporter le "gène médicament" et de compenser la synthèse protéique absente chez les individus atteints (figure 21). C'est le cas de maladies comme la myopathie de Duchenne ou la mucoviscidose.

Figure 21: La thérapie génique d'augmentation : par simple addition d'un allèle fonctionnel, il est possible de traiter un certain nombre de maladies héréditaires liées au déficit génétique du produit d'un gène [111].



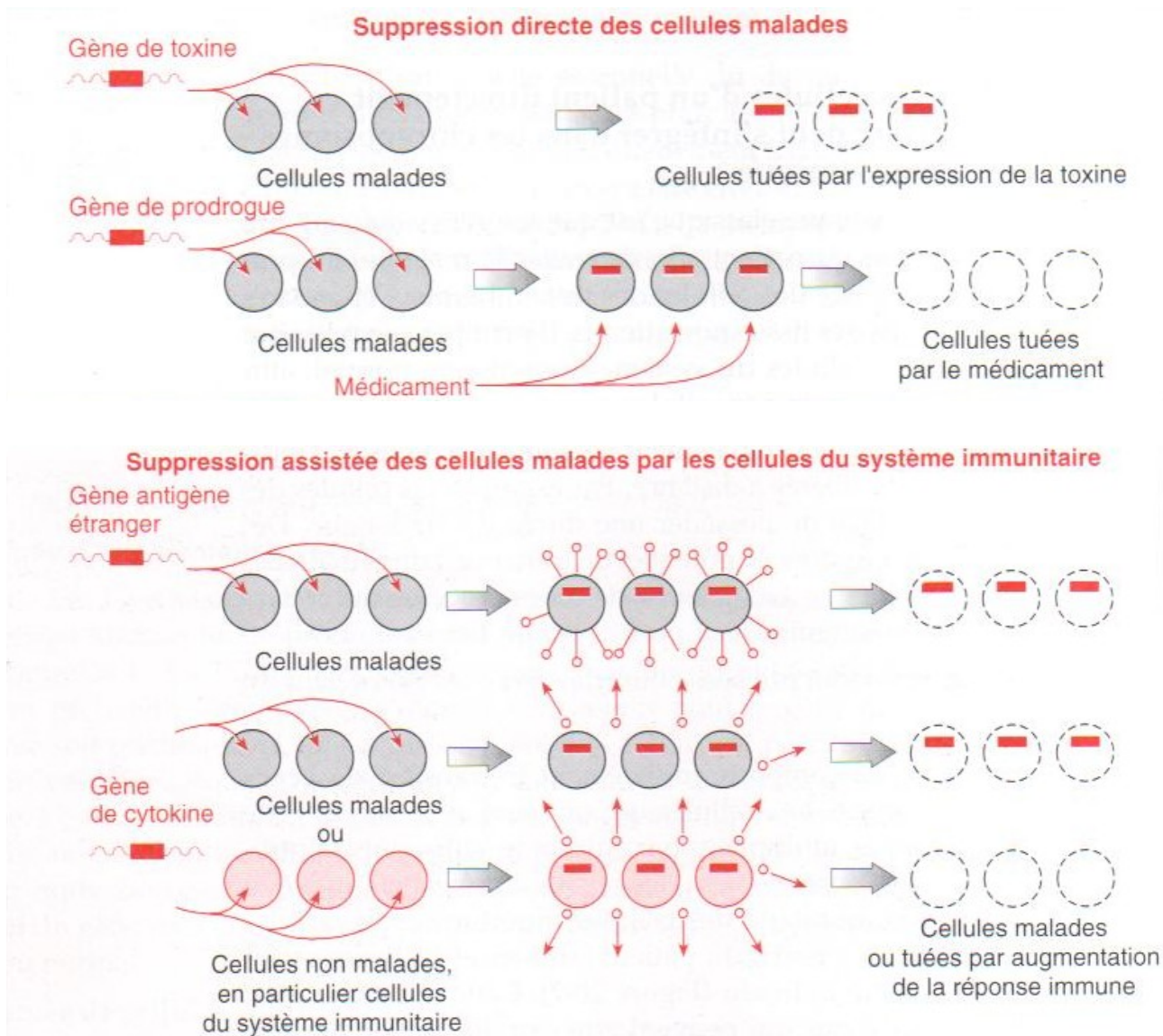
Il est plus difficile, à l'inverse, de pallier une mutation génique ayant pour conséquence un gain de fonction, de transmission généralement dominante. En effet, la thérapie génique a alors pour tâche soit d'inhiber directement l'expression de ce gène muté, soit de pallier aux effets délétères de son expression en produisant une protéine "compensatrice".

A terme, la thérapie génique dans son ensemble devrait s'appliquer à des affections génétiques pouvant être traitées par l'apport d'une protéine thérapeutique dans la circulation sanguine (facteurs de croissance, hormones, facteurs de coagulation...). Néanmoins, certaines affections auront du mal à trouver en la thérapie génique une solution de traitement, étant donné la difficulté de délivrer le gène thérapeutique dans un nombre suffisant de cellules et de lui permettre de fonctionner au niveau requis de façon prolongée.

b – Le cancer, une maladie à la génétique complexe [27]

Deux stratégies thérapeutiques faisant appel à la thérapie génique peuvent être retenues (figure 22): l'immunothérapie et la sensibilisation des cellules cancéreuses à des médicaments. L'objectif de l'immunothérapie est d'augmenter l'antigénicité des cellules cancéreuses ainsi que la réactivité des cellules immunitaires de l'hôte, afin d'amplifier la réaction immune contre les cellules tumorales. Dans la seconde stratégie, un gène est intégré à des cellules du patient afin qu'une enzyme donnée soit produite; cette enzyme permet l'activation d'un médicament cytolytique et son action sur les cellules tumorales. Un exemple est l'utilisation d'un gène du virus *Herpes simplex* (le gène de la thymidine kinase) qui, une fois exprimé par les cellules l'ayant intégré, leur permet d'être sensibles à des médicaments antiherpétiques comme le ganciclovir ou l'aciclovir. Cette stratégie est appelée « gène suicide ». Les essais effectués chez l'animal ont montré des résultats encourageants que l'on ne retrouve pas chez l'Homme à ce jour. Deux autres perspectives thérapeutiques récemment développées consistent à provoquer, toujours par thérapie génique, l'apoptose des cellules tumorales ou bien à leur faire sécréter des substances antiangiogéniques ; cela provoque ainsi la mort des cellules tumorales par défaut d'irrigation sanguine.

Figure 22: Deux approches de thérapie génique du cancer : la suppression directe des cellules malades, et la suppression assistée des cellules malades par les cellules du système immunitaire [111].



Malgré cela, la thérapie génique du cancer présente deux limites non élucidées à ce jour: tout d'abord, elle est en général à visée locale, alors que la gravité des cancers réside dans leur pouvoir métastatique via la circulation générale. En outre, les cellules malignes présentent la particularité de s'adapter aux traitements anticancéreux par un mécanisme de labilité génomique; pour ces deux raisons, le traitement actuel de la plupart des cancers passe par l'utilisation combinée de la thérapie génique et de stratégies comme la chimiothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie et bien sûr l'exérèse chirurgicale lorsque celle-ci est possible.

c – Thérapie génique des maladies virales

De nombreuses stratégies de thérapie génique ont été développées dans le but de perturber les différentes phases du cycle de multiplication des virus, soit en produisant dans la circulation une protéine anti-virale, soit en modifiant la cellule cible de l'infection virale qui devient alors résistante

au virus ou, au contraire, est rapidement éliminée à son contact, empêchant au virus de perpétuer son infection. Le développement de telles stratégies a vu le jour dans les années 1990 essentiellement pour contrer l'infection par le virus du HIV. Infection d'autant plus difficile à maîtriser qu'il faudrait faire pénétrer le gène thérapeutique dans les cellules souches de la moelle des patients. Les recherches actuelles espèrent parvenir à conférer une résistance transitoire mais prolongée aux lymphocytes circulants des malades, dans l'attente éventuelle d'un traitement définitif.

d – Gène vaccin

La vaccination consiste en la persistance minime et transitoire d'un antigène donné, au niveau d'un site limité. La thérapie génique est un outil adapté à la mise en œuvre d'ADN nu codant pour des antigènes vaccinaux et administré par voie intramusculaire ou intradermique. L'expérimentation animale a permis de montrer qu'il était ainsi possible d'obtenir une réaction immunitaire cellulaire et humorale suffisante envers de nombreux agents infectieux. Actuellement, des essais chez l'Homme laissent espérer une véritable révolution dans les pratiques vaccinales, l'ADN étant une molécule peu onéreuse et stable, donc facilement transportable dans les pays n'ayant pas accès à une chaîne du froid ou à des conditions de transport rigoureuses.

e – Thérapie génique et maladies diverses acquises

En tant que stratégie visant à produire une protéine à effet thérapeutique via un "gène médicament", la thérapie génique pourrait s'avérer utile dans des thérapeutiques à visées hormonale (diabète, maladies sanguines...), angiogénique (artérites des membres inférieurs, ischémie cardiaque...), etc. Récemment des chercheurs se sont penchés sur les protéines impliquées dans le développement embryonnaire et essaient de conférer à des hépatocytes les propriétés des cellules pancréatiques. Cela permettrait à terme, de redonner aux patients diabétiques la capacité de produire de l'insuline de façon spontanée.

On comprend, à travers la diversité des applications de la thérapie génique, que les essais cliniques se développent ; en particulier depuis la formidable avancée en 1999 d'Alain Fisher et de son équipe dans le traitement des « enfants bulles ». Derrière un même principe, à savoir celui d'utiliser le gène comme médicament, se cachent des potentiels thérapeutiques que chacun tente d'exploiter, avec plus ou moins de réussite pour le moment. Où en est la recherche dans le domaine de la thérapie génique à ce jour, aussi bien à l'échelle du Chien, modèle unique en bien des points, qu'à celle de l'Homme?

B – Les modèles animaux en thérapie génique

La majorité des essais cliniques actuellement mis en évidence chez l'Homme ont préalablement été validés chez les modèles animaux. Le domaine de la thérapie génique, comme celui de la génétique dans son ensemble, a beaucoup utilisé la Souris, premier modèle de Mammifère sur lequel différentes maladies génétiques ont été mises en évidence. Il en existe bien d'autres, dont la liste exhaustive présenterait ici peu d'intérêt. Il semble plus intéressant de citer les principaux utilisés, en illustrant les avantages et inconvénients de chacun au travers d'un exemple de réussite thérapeutique récente par thérapie génique.

1 – La Souris : intérêts et limites [91, 121]

La Souris est l'animal de laboratoire par excellence et se prête très bien aux essais les plus divers. Il faut rappeler que la Souris est source d'études et d'attentions depuis plusieurs centaines d'années et son intérêt en recherche, pour la thérapie génique, n'est plus à prouver.

Un premier atout de la Souris en tant que modèle en thérapie génique concerne sa physiologie reproductive. En effet, la gestation (trois semaines environ) et le sevrage sont courts, la maturité sexuelle est atteinte rapidement après la naissance (deux mois environ) si bien que l'intervalle entre deux générations est court et plusieurs générations sont obtenues dans la même année. La prolificité est bonne puisque l'on compte en moyenne 9 petits par portée sur des souris saines. Enfin, il faut souligner que le contrôle des accouplements est relativement aisé. Le modèle Souris permet donc d'obtenir un grand nombre d'individus sur une courte durée, élément essentiel d'un point de vue épidémiologique; en effet, les résultats des recherches sont d'autant plus interprétables lorsque les essais sont effectués sur des populations de grande échelle, homogènes et qui vivent dans un même milieu en subissant les mêmes stress. En cela, la Souris est un précieux outil. Enfin, l'espérance de vie de 2 ans laisse un certain délai dans l'analyse des effets de la thérapie génique tentée sur les animaux.

La Souris est un animal sociable facile à manipuler ; son utilisation ne requiert que rarement l'emploi d'une contention particulière et les conséquences liées aux stress subis sont négligeables lorsqu'on les compare à d'autres modèles comme le Chat par exemple. Les individus peuvent cohabiter sur un même espace sans problème, ce qui permet de les élever dans des espaces restreints et avec de grandes densités d'individus. Leur entretien est peu coûteux et facile : les besoins des souris, même lorsqu'elles sont atteintes d'une maladie génétique, sont simples, ce qui n'est pas le

cas des Chiens et Chats par exemple qui nécessitent bien souvent un nursing constant et lourd à gérer.

D'un point de vue génétique, il est possible de « créer » des lignées d'individus dont le génotype est choisi pour mieux étudier une maladie. Les génomes de la Souris et de l'Homme sont approximativement de la même taille, et contiennent environ 20 000 gènes qui pour certains, sont agencés de la même façon mais sur des chromosomes différents [46]. Les Souris *mdx*, myopathes, sont issues d'un travail de sélection et tous les individus sont homogènes génétiquement (les facteurs de variation individuels sont très limités). Un des arguments importants expliquant l'usage intense des souris comme modèle génétique est la possibilité donnée aux scientifiques d'isoler des cellules souches embryonnaires et d'en modifier le patrimoine génétique. Réimplantées dans un embryon, ces cellules participent à la formation de la future souris et bien souvent aux cellules de la lignée germinale, permettant ainsi la création de lignées de souris génétiquement modifiées.

Mammifère dont la physiologie se rapproche de celle de l'Homme, la Souris permet l'étude de maladies génétiques communes aux deux espèces; par leur aspect génétique premièrement (le séquençage du génome de la Souris est établi), mais aussi par les examens d'exploration permis (par exemple les biopsies musculaires, les injections intraveineuses de vecteurs...). Pour en revenir à l'exemple de la myopathie, les biopsies du myocarde des souris *mdx* sont faites post-mortem. Il est plus aisé d'euthanasier des groupes de souris suivant leur âge qu'un groupe de chiens dont l'élevage est déjà difficile.

Cependant, le modèle Souris présente certains inconvénients. Au regard de son gabarit tout d'abord, la Souris est loin d'être le modèle animal le plus proche de l'Homme, même si de nombreuses maladies génétiques sont régies par les mêmes mécanismes chez ces deux espèces. Parallèlement, le degré de complexité dans la pathogénie des maladies génétiques chez la Souris reste souvent limité du fait de l'utilisation de lignées consanguines homogènes génétiquement, tandis que les maladies plurifactorielles de l'Homme sont particulièrement difficiles à explorer et à comprendre. Rongeurs de petite taille, la Souris et le Rat ne seront jamais aptes à renseigner les scientifiques sur l'impact des stress environnementaux par exemple. Enfin, leur courte espérance de vie ne pourra pas permettre de juger des conséquences (néfastes ou non) d'un traitement par thérapie génique sur plusieurs années.

Modèle dont la formidable expansion a suscité l'enthousiasme, la Souris offre l'avantage d'être facilement disponible et prolifique ; il ne faut pourtant pas oublier les différences de complexité dans le traitement des maladies génétiques de l'Homme et de celles du modèle Souris. Outil indispensable à la compréhension des mécanismes régissant les maladies génétiques, la Souris se place comme une étape dans le développement de modèles plus complexes comme le Chien ou le Singe.

2 – Autres modèles animaux [24, 102]

Pour les raisons évoquées ci-dessus, on constate depuis quelques années l'apparition de modèles animaux de plus gros gabarit qui complètent les avancées faites grâce à la Souris. Parce qu'ils ont une plus grande espérance de vie, une taille comparable à celle d'un être humain et une hétérogénéité génétique plus marquée, les grands modèles animaux sont de plus en plus étudiés. Les investigations permises par ces derniers sont moins limitées que chez la Souris ; par exemple, le rapport de taille entre un encéphale de nourrisson et de souris est de 1000, alors qu'il est de 10 entre celui d'un petit chien et d'un nouveau-né. De même, grâce à la longévité et à la taille de ces nouveaux modèles, les scientifiques arrivent plus facilement à avoir des informations sur l'efficacité à long terme et la sécurité de telle ou telle thérapie.

Le nombre de modèles animaux de grand gabarit pour les maladies humaines est aujourd'hui important et ne cesse d'augmenter. Nous ne dresserons pas la liste exhaustive des modèles actuellement utilisés, mais présenterons les plus employés, leurs domaines d'applications et les limites qu'ils sont susceptibles de présenter.

a- Le modèle félin

Plus difficile à élever en collectivité que le Chien, le Chat présente cependant de nombreux intérêts et des maladies génétiques communes avec l'Homme. Le stress causé par les conditions de vie en chatterie et les manipulations lors des expérimentations nécessitent certaines précautions ; en effet, il n'est pas aussi aisé d'élever un chat parmi de nombreux congénères en raison de son indépendance plus marquée. L'environnement est important à maîtriser afin de minimiser l'impact de ce facteur sur les résultats d'un traitement par thérapie génique. Cependant, même si la gestion du Chat comme modèle expérimental demande quelques précautions et un investissement matériel conséquent, cet animal est d'un intérêt particulier pour les maladies neurologiques, étant donné que le cerveau félin est très bien caractérisé au niveau structural mais aussi fonctionnel.

Aussi, nous prendrons l'exemple de l'alpha-mannosidose féline (AMD). La mannosidose correspond à une surcharge glycoprotéique due à une déficience en acide alpha-mannosidase. Il en résulte une accumulation de mannose (oligosaccharide) dans les lysosomes. Chez le modèle félin, la mutation à l'origine de la maladie est une délétion de 4 paires de bases qui mène à un décalage du cadre de lecture et à l'apparition d'un codon stop prématuré. Les chats atteints présentent des tremblements intentionnels, des pertes d'équilibre, un nystagmus, une ataxie. Histologiquement, les neurones présentent des lésions de surcharge. Les signes cliniques sont toujours évolutifs et aboutissent généralement à une décision d'euthanasie des animaux malades alors âgés de 18 à 20 semaines.

Il a été prouvé qu'un faible nombre de cellules capables de synthétiser l'enzyme normale suffit à corriger les lésions de stockage. Afin de tester l'efficacité du transfert de gène, des chatons atteints d'AMD de 8 semaines ont reçu de multiples injections intracrâniennes de vecteurs (AAV) exprimant l'ADNc de la alpha-mannosidase normale. Les examens neurologiques ont alors montré une amélioration clinique indéniable comparée aux animaux non traités. A l'âge de 18 semaines, les chatons ont montré alors des signes cliniques fortement atténués, alors que les témoins ont été euthanasiés en raison de la sévérité de leur atteinte générale. Un examen d'imagerie par résonance magnétique a confirmé l'augmentation du nombre de fibres myélinisées au niveau de l'encéphale. Enfin, l'activité de l'enzyme normale a pu être mesurée dans certaines sections de l'encéphale des animaux traités ; elle était égale à 4% de l'activité présente chez un chat sain.

L'espérance de vie moyenne du Chat (supérieure à celle du Chien), son gabarit ainsi que la complexité fréquente du déterminisme des maladies génétiques qu'il peut manifester en font un modèle intéressant et de plus en plus utilisé en thérapie génique. Il nécessite néanmoins des conditions spécifiques et rigoureuses d'élevage pour être pleinement exploité.

b- Le modèle équin

Plus le gabarit du modèle animal considéré est important, plus celui-ci est coûteux à obtenir et à entretenir, et exigeant sur les conditions de vie qu'il nécessite. Aussi le Cheval, herbivore monogastrique, est difficile à développer à grande échelle dans un contexte expérimental, et seules des structures possédant des locaux, un matériel et une équipe formée sont aptes à tirer profit de

cette espèce. Le Cheval est utilisé majoritairement comme modèle pour les ostéoarthrites, car ces affections ont une forte incidence dans cette espèce. Et bien qu'il existe un grand nombre de maladies fortement représentées de façon naturelle chez le modèle équin, seul le mélanome a été utilisé dans des essais de thérapie génique.

On retrouve le mélanome chez 80% des chevaux à robe grise âgés de plus de 12 ans. Etonnamment, ils sont relativement encapsulés et ne métastasent que tardivement, contrairement aux mélanomes retrouvés chez l'Homme. Cependant, il a été démontré qu'au niveau histologique et immunologique de nombreux points communs existaient entre ces deux espèces, faisant du Cheval un modèle intéressant pour l'étude de ce type tumoral. Dans l'étude rapportée, un plasmide contenant une séquence d'ADN codant pour l'interleukine 12 a été injectée dans les lésions métastatiques de chevaux atteints. Aucun effet n'a été alors observé. Par contre, trois injections du même type espacées chacune de 2 semaines ont permis d'obtenir une réduction de taille des masses tumorales et une totale disparition (sur un des sujets). En moyenne, les tumeurs ont diminué de 41% par rapport à leur taille initiale, alors que les tumeurs non traitées ont augmenté de 107% durant la même période. Néanmoins, un suivi à plus long terme n'a pas permis d'obtenir une diminution supplémentaire de taille, et ce malgré le renouvellement des injections du vecteur. Des études histologiques de ces lésions traitées par thérapie génique ont montré un afflux important de lymphocytes CD4 et CD8, jamais observé chez des individus atteints non traités.

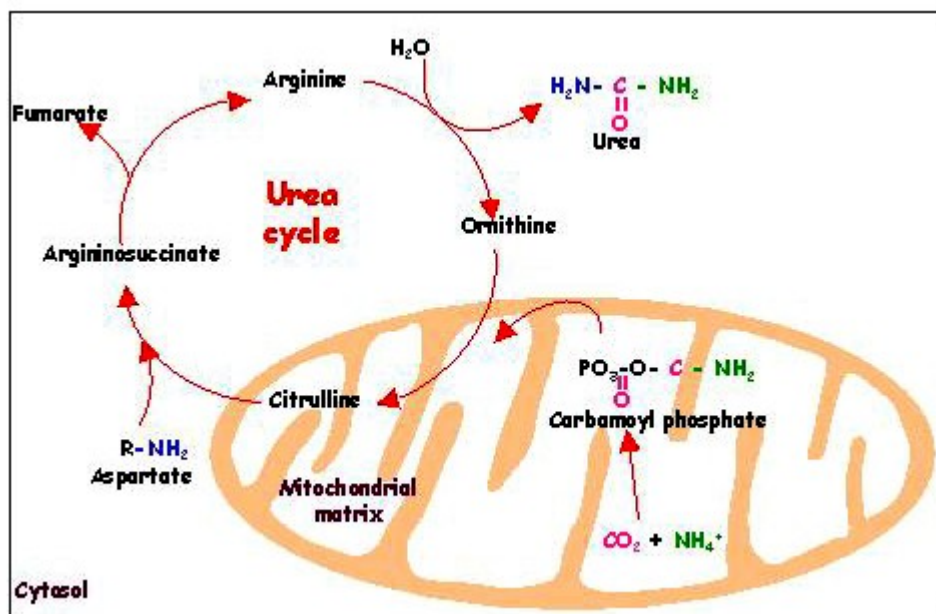
Les essais chez le Cheval ont commencé bien après les recherches sur la Souris. Ceci explique que les succès de thérapie génique soient encore rares ou complets. Cependant, la prédisposition de cette espèce pour de multiples affections génétiques communes avec celles de l'Homme ouvre de nombreuses opportunités quant à son utilisation comme modèle, à condition néanmoins d'en assumer la lourdeur à la fois financière et matérielle.

c- Le modèle bovin

Il a fallu attendre longtemps pour que les bovins soient utilisés dans des essais en thérapie génique, sans doute à cause de leur gabarit et du coût de production de vecteurs viraux en grand nombre. Les veaux à la naissance pèsent une trentaine de kilogrammes, ce qui correspond au poids moyen d'un enfant ; les recherches en thérapie génique sur ces modèles se sont donc orientées vers

les maladies génétiques affectant de jeunes individus humains. L'une d'entre elles, pour lequel le veau représente un modèle unique est appelée citrullinémie (figure 23).

Figure 23: Place de la citrulline dans le cycle de l'urée . D'après le site internet www.edoc.hu-berlin.de.



Il s'agit d'un dysfonctionnement du cycle de l'urée caractérisé par une hyperammoniémie, et causé par une mutation non sens au niveau du gène codant pour l'argininosuccinate synthétase chez le veau. La citrullinémie chez les veaux nouveau-nés se traduit par des signes neurologiques évolutifs aboutissant à la mort après quelques jours de vie. Dans un récent essai, deux veaux atteints ont reçu des rations supplémentées en arginine et benzoate durant la période post-natale. A l'âge de 8 jours, ils ont reçu un adénovirus inactivé contenant l'ADNc codant pour l'argininosuccinate synthétase par voie intraveineuse. Les effets de la thérapie génique ont été évalués cliniquement et biochimiquement. La concentration en citrulline plasmatique fut diminuée chez les deux animaux 16 jours après l'injection et a atteint des valeurs comprises dans les normes, ce qui a révélé que la synthèse de l'urée était efficace. Aucun signe d'inflammation n'a été détecté lors de l'examen histologique des veaux, ce qui a démontré que le vecteur a été toléré et ne présentait pas de dangerosité à court terme pour les organismes traités.

Comme le montre cette étude, il y a encore peu de recul sur les essais menés sur les bovins en raison de leur récente apparition en tant que modèles animaux en thérapie génique. De plus grands effectifs seront nécessaires à l'avenir pour pouvoir tirer profit au mieux de ces animaux.

d- Le modèle porcin [21]

Le porc est une des espèces qui a connu le plus grand développement récent en terme de modèle pour les maladies de l'Homme, et ce dans divers domaines. Ce mammifère monogastrique présente de nombreuses similitudes physiologiques avec l'être humain, d'une part du point de vue de son développement anatomique, mais aussi du fonctionnement de ses différents appareils (digestif, cardiovasculaire,...). L'industrie alimentaire actuelle prouve que le Porc est un animal que l'on peut élever sans trop de difficultés en regroupant de grands effectifs sur de faibles superficies. De plus, la prolificité d'une truie est bonne, avec en moyenne 8 petits par portée, ce qui permet d'obtenir rapidement des échantillons conséquents. Il serait illusoire de dresser ici une liste exhaustive des différents domaines de la thérapie génique utilisant le Porc comme modèle animal. Nous donnerons néanmoins un exemple d'essai récent, afin de démontrer l'utilité de cet animal dans la recherche sur les affections à déterminisme génétique de l'Homme.

Un essai intéressant de succès en thérapie génique chez le Porc concerne l'utilisation de vecteurs adénoviraux dans le but de pallier à un trouble du rythme cardiaque, ici le bloc atrioventriculaire [21]. Cette expérience, dont les résultats ont été publiés en 2006 a consisté à étudier le transfert d'un nucléotide cyclique d'hyperpolarisation activée (HCN), molécule indispensable à l'activité pacemaker du cœur. Une sous-unité importante d'HCN, le HCN4, a été transférée, par un adénovirus, dans le but de traiter les bradyarythmies causées par le bloc atrioventriculaire. Un vecteur témoin (dit vecteur GFP exprimant la *Green Fluorescent Protein*) a également été utilisé, à titre comparatif. Les porcs utilisés ont subi une ablation de leur nœud atrioventriculaire, afin de créer de façon iatrogène le bloc. Après transfert génétique, on a constaté que les porcs traités par vecteur HCN4 voyaient leur fréquence cardiaque redevenir sensible à l'action de bêta-adrénérgiques comme l'isoproterenol par exemple. L'expression de la molécule HCN4 dans le myocarde a de plus été confirmée par immunofluorescence et par technique PCR. Ainsi, cette étude a montré qu'il était possible, par thérapie génique, de surexprimer la molécule HCN4 lors d'atteinte cardiaque arythmique.

Le porc, par son gabarit comparable à celui de l'homme, peut recevoir des traitements de thérapie génique par cathétérisme intraveineux. Cette voie d'administration est difficilement envisageable sur des modèles comme le Rat ou la Souris, pour lesquels des procédures hydrodynamiques sont nécessaires afin d'assurer le transfert des vecteurs. De nombreux essais décrivent l'utilisation du cathétérisme, et expliquent que cette technique peu invasive (même si elle

nécessite une anesthésie générale) permet d'accéder directement au site que l'on souhaite traiter, via un marquage des trajets veineux et des sites désirés [6].

Les affections cardiaques et hépatiques occupent le devant de la scène parmi les essais en cours et préalablement effectués chez le Porc. Il est certain que ce modèle continuera de se développer et de contribuer à la compréhension des maladies génétiques de l'Homme.

e- Le modèle singe

Le dernier modèle présenté ici serait de loin le modèle idéal après l'Homme lui-même, pour la raison évidente du lien phylogénique qu'il existe entre ces deux espèces. Le développement embryonnaire, comportemental, mais aussi le mode de vie, le régime alimentaire...sont autant de points communs qui, conjugués aux prédispositions génétiques, font des primates des modèles hors norme pour la thérapie génique. Néanmoins, il existe encore peu d'essais publiés relatant leur utilisation, comparé à des animaux plus accessibles comme la Souris ou le Porc. Le Singe est en effet un animal difficile à obtenir comme animal de laboratoire, en raison de nombreuses barrières légales et éthiques ; de plus, son entretien est coûteux et nécessite une équipe aguerrie et des locaux adaptés. Il faut noter enfin que la possibilité pour le Singe d'être un agent transmetteur de zoonoses impose l'usage de mesures sanitaires et sécuritaires plus lourdes.

Un exemple de recherche laissant espérer un succès futur de la thérapie génique chez l'Homme concerne la leucodystrophie métachromatique [24]. La leucodystrophie métachromatique est la plus fréquente des leucodystrophies et est causée par la mutation du gène codant pour l'arylsulfatase A, entraînant une incapacité à cataboliser les cérébrosides sulfates. Les cérébrosides sulfates sont présents dans tout l'organisme mais surtout au niveau du système nerveux central, des reins et des gonades. Trois sous-types de leucodystrophie métachromatique existent : la forme infantile tardive (60% d'incidence), la forme juvénile (25%) et la forme adulte (15%). L'âge de survenue de la maladie est habituellement le même dans une famille atteinte. Toutes les formes de cette maladie s'accompagnent de troubles neurologiques sévères et de pertes des fonctions intellectuelles. La durée de la maladie est de trois à dix ans dans la forme infantile tardive et parfois de plus de 20 ans dans les autres formes. Le décès est habituellement dû à des infections le plus souvent pulmonaires.

Dans l'étude expérimentale publiée en 2007, l'auteur Margret Casal a analysé la toxicité et l'efficacité chez le Singe du transfert de l'arylsulfatase A (ARSA) par le vecteur AAV2.5 dans cette maladie de surcharge lysosomiale. Après trois injections cérébrales unilatérales, une légère réaction inflammatoire a été observée ; l'ARSA a diffusé sur plus de 4 cm cranio-caudalement dans

l'hémisphère cérébral traité, et localement dans le controlatéral. Ces résultats ont confirmé la faisabilité de cette étude chez l'Homme [12, 24].

On comprend l'intérêt évident du Singe comme modèle pour l'application des recherches chez l'Homme. Mais la faible disponibilité de ces animaux, le nursing quotidien qu'ils nécessitent et le coût occasionné rend le développement de ce modèle progressif et limité.

La liste des modèles animaux ne se résume pas à ceux présentés ci-dessus. Ces derniers démontrent tout de même qu'il est difficile d'obtenir une espèce idéale, à la fois concernant sa disponibilité, son coût, son degré de similitude avec l'Homme et la complexité des expériences permises. Malgré tout, ces modèles permettent, depuis plusieurs décennies pour certains, de nombreux progrès dans le domaine de la thérapie génique. C'est ainsi qu'une fois validés chez le modèle animal, certains essais ont été appliqués à l'être humain.

C – La thérapie génique chez l'Homme

La thérapie génique a fait ses débuts en tant que révolution probable dans le traitement des maladies génétiques. Mais très rapidement les chercheurs se sont rendus compte que des affections acquises, nécessitant parfois uniquement un traitement temporaire sur un plus faible nombre de cellules, étaient également des cibles de choix pour la thérapie génique. Depuis lors, leurs travaux se sont centrés sur la production de vecteurs toujours plus performants dans l'expression de gènes

thérapeutiques. Parallèlement, les efforts se sont dirigés aussi en fonction de l'importance du marché des affections humaines, les maladies les plus fréquentes n'étant pas les maladies héréditaires dans bien des cas.

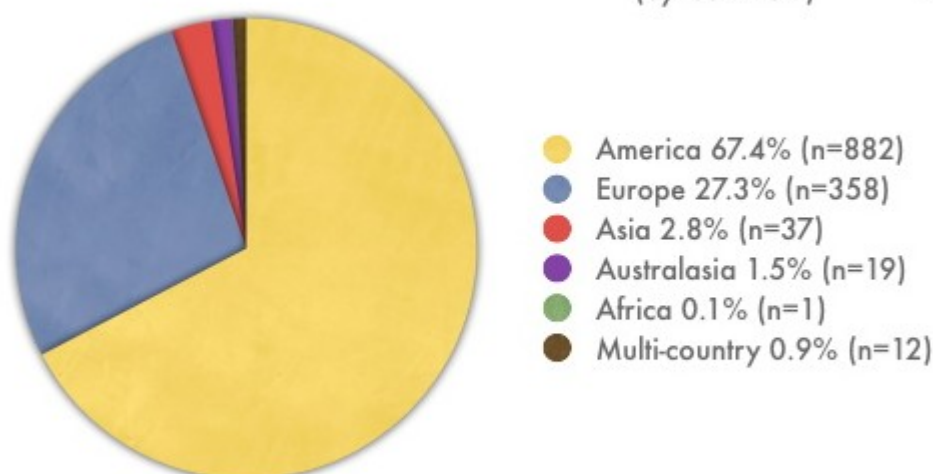
1 – La thérapie génique humaine en 2007 [104]

a - Répartition des essais cliniques selon les continents

Alors que l'on recensait 500 essais cliniques aux Etats-Unis en 2001, on en dénombre aujourd'hui plus de 800 (données du Comité Consultatif de l'ADN Recombinant américain, ou Recombinant DNA Advisory Committee, ou RAC). La recherche en thérapie génique est moins développée dans le reste du monde, puisque les deux tiers (67,4%) des tests sont effectués outre-atlantique (figures 24 et 25).

Figure 24: Répartition géographique par continent des essais cliniques de thérapie génique chez l'Homme en 2007 [104].

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials (by Continent)



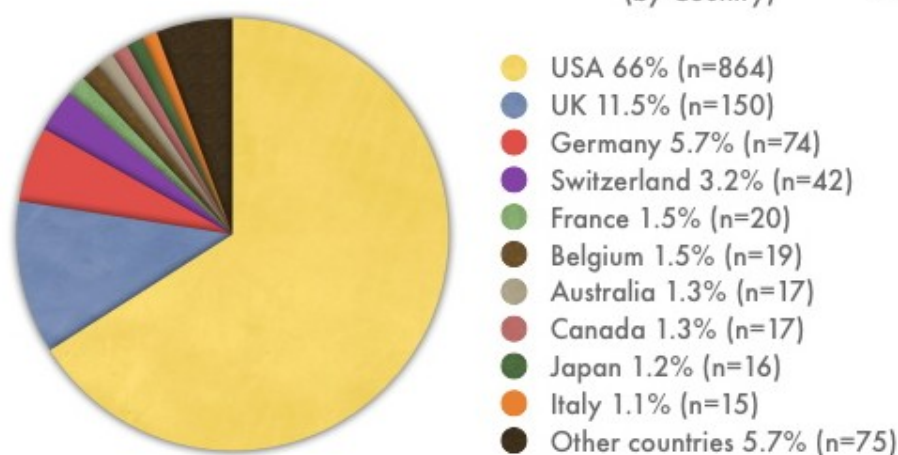
The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Cela s'explique en partie par une législation américaine beaucoup plus souple vis-à-vis de l'expérimentation, mais aussi parce que les moyens mis en œuvre dans ce domaine de la génétique sont colossaux comparés à d'autres pays. On comprend alors mieux pourquoi 95% des essais s'effectuent dans des pays développés, à savoir aux Etats-Unis et en Europe (et plus particulièrement au Royaume-Uni). Une étude américaine réalisée en 2001 avait comptabilisé 2088 personnes ayant déjà eu des cellules modifiées génétiquement, quelque soit le procédé...

Figure 25: Répartition géographique par pays des essais de thérapie génique chez l'Homme en 2007 [104].

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials (by Country)



The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

b – Les maladies à l'étude

L'utilisation de la thérapie génique dans les maladies acquises (25,2% des essais cliniques) s'est, à côté du cancer (66%), progressivement accentuée pour les raisons évoquées précédemment. Cependant les recherches sur les maladies génétiques monogéniques (8,3%), même si elles sont plus rares, se poursuivent, aidées par de nombreuses associations à fort pouvoir médiatique telle que l'Association Française de lutte contre les Myopathies (AFM).

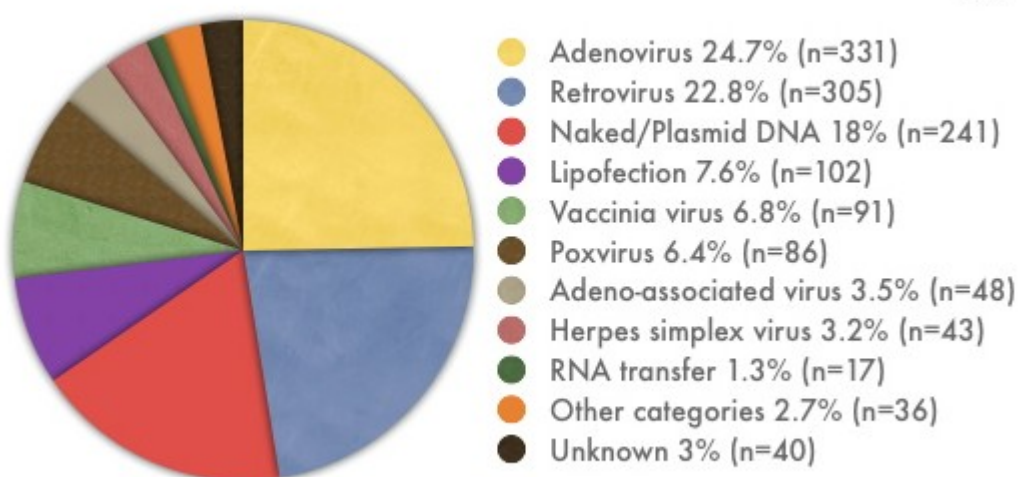
Au total, plus de 1300 travaux sont actuellement en cours et l'on constate la diversité des domaines abordés, comme par exemple les essais d'innocuité effectués sur des volontaires sains.

c – Les vecteurs de thérapie génique

Un des points clés de maîtrise d'un protocole de thérapie génique est la production de vecteurs sûrs et efficaces permettant une expression ciblée, contrôlée et prolongée des gènes thérapeutiques. C'est ce sur quoi se penchent bon nombre d'équipes de recherche, adénovirus et rétrovirus représentant près de la moitié des vecteurs développés. L'ADN nu et l'ADN plasmidique pour la thérapie *in situ* sont les deux autres types de vecteurs majoritairement produits, le reste étant pour le moment peu représenté, soit en raison d'un manque de connaissance, soit parce que leur utilisation en thérapie génique est accompagnée d'inconvénients majeurs (figure 26).

Figure 26: Les différents types de vecteurs utilisés dans les essais de thérapie génique en 2007 [104].

Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd

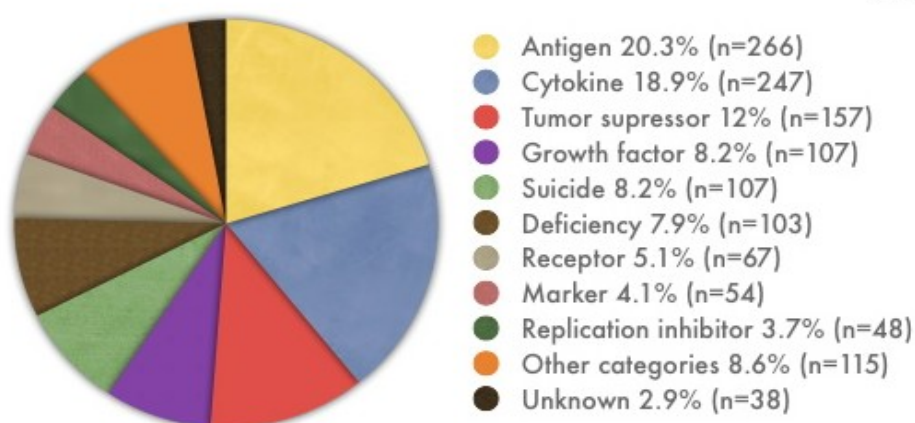
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

d – Les gènes transférés

Différentes stratégies ont été initiées, incluant principalement le transfert de gènes dits "suppresseurs de tumeurs" (18,9% de la totalité des gènes transférés) et de gènes codant afin de développer des antigènes tumoraux pour des vaccins thérapeutiques (20,3%) (figure 27).

Figure 27: Les différentes catégories de gènes transférés dans les essais de thérapie génique en 2007 [104].

Gene Types Transferred in Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd

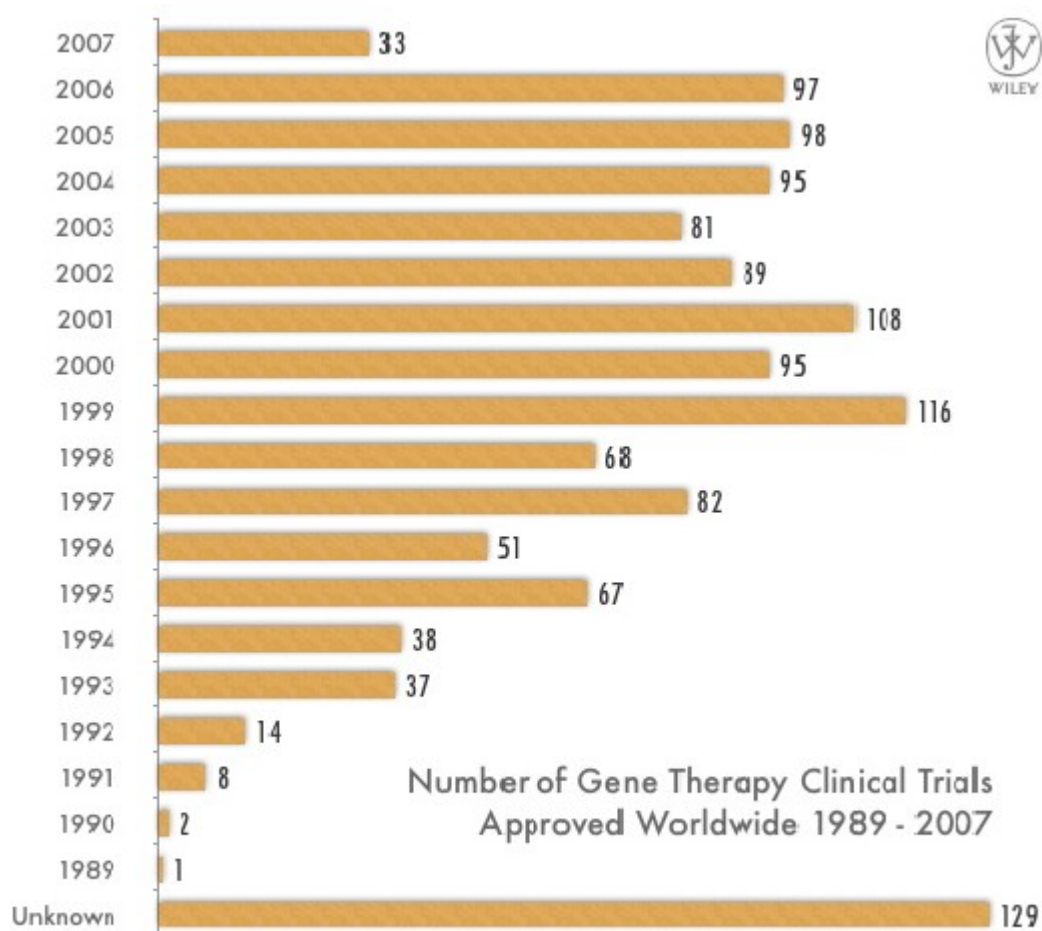
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

On remarquera que très peu d'essais concernent le traitement des maladies dues à une insuffisance d'une protéine (maladies génétiques en particulier) : 7,9%.

e – Evolution du nombre d'essais cliniques de 1987 à 2007

C'est avec le succès de Steven Rosenberg et de son équipe en 1990 (concernant le traitement du déficit en ADA) que les essais de thérapie génique se sont multipliés pour atteindre leur apogée en 1999 avec 116 travaux lancés. C'est malheureusement cette même année que l'on constata le décès de Jerry Jelsinger, patient américain, suite à l'injection de trop fortes doses d'un vecteur dérivé d'un adénovirus. A l'époque, cette nouvelle ébranla la communauté scientifique, et l'on comprend alors mieux l'évolution du nombre d'essais approuvés mondialement sur les années qui suivirent (figure 28).

Figure 28: Nombre d'essais de thérapie génique validés par année, de 1989 à 2007 [104].



The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

f – Les phases des essais cliniques actuels [44]

Un essai clinique se déroule le plus souvent en quatre phases.

- Étude de phase I

Faisant suite à une phase expérimentale animale, elle représente la première phase de test d'un médicament. Il s'agit d'évaluer la tolérance et l'absence d'effets secondaires chez des groupes de sujets le plus souvent volontaires sains, dont l'effectif est réduit (moins de 100 personnes généralement). Parfois ce sont des essais proposés à des patients malades dont les traitements déjà commercialisés ne donnent pas les résultats escomptés. Cette phase permet également d'étudier la cinétique et le métabolisme, chez l'Homme, de la substance étudiée.

- Étude de phase II

Durant cette phase, on cherche à évaluer précisément les effets secondaires du traitement sur des groupes pouvant aller jusqu'à 300 personnes. La dose optimale médicamenteuse à administrer est aussi fixée.

- Étude de phase III

Elle compare le traitement soit à un placebo, soit à un traitement de référence sur des groupes de taille importante, souvent plusieurs milliers de participants. Il s'agit de programmes extrêmement onéreux, payés par les compagnies pharmaceutiques. Compte tenu des enjeux financiers, certaines dérives éthiques ont été dénoncées dans le passé.

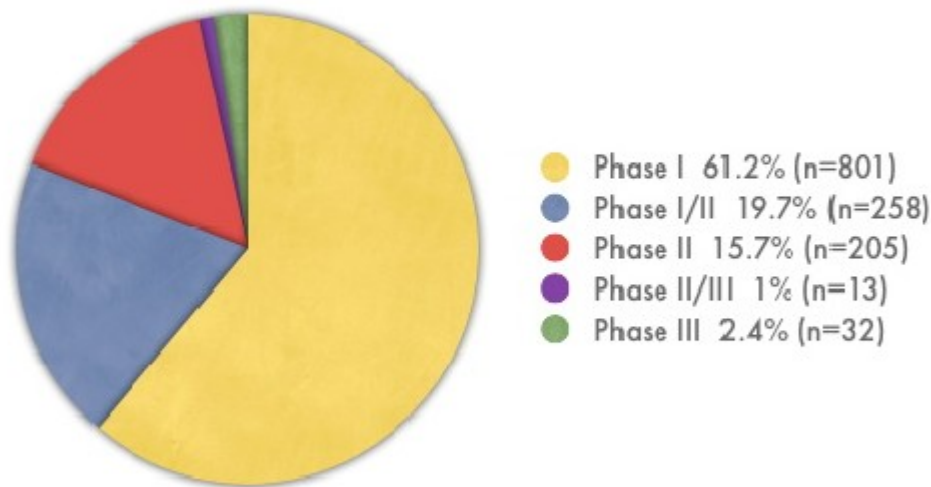
- Étude de phase IV

La phase IV consiste à suivre l'évolution du traitement sur le long terme, en particulier à veiller à d'éventuels effets secondaires pouvant survenir tardivement, après que le traitement ait été commercialisé.

La majorité des essais cliniques sont en phase I (plus de la moitié): la thérapie génique reste expérimentale dans bien des domaines et sa maîtrise demeure loin d'être parfaite (figure 29).

Figure 29: Répartition par phase des essais cliniques de thérapie génique en 2007 [104].

Phases of Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2007 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

De plus, des projets voient le jour sans pour autant arriver au terme des quatre phases, nombreuses étant les désillusions financières ou techniques. Uniquement 32 essais cliniques sont parvenus en phase III; mais rappelons qu'il s'agit là de travaux effectués en thérapie génique humaine, domaine dans lequel encore beaucoup de considérations éthiques font obstacle aux avancées (figure 33). Les recherches sont pour l'heure plus aisées et moins onéreuses chez l'animal, comme nous le verrons pour le modèle canin.

2 – La thérapie génique: problèmes éthiques et législation [27]

En tant que traitement par un "gène médicament", la thérapie génique soulève de nombreuses problématiques associées à la manipulation du génome humain essentiellement. Une réglementation rigoureuse constitue un outil indispensable à l'établissement d'une relation de confiance entre l'opinion public et l'équipe des chercheurs en génétique médicale, si l'on veut que la thérapie génique se fasse une place au cours des années à venir parmi les outils hospitaliers de routine.

a – Thérapie génique: problèmes éthiques, sociologiques et financiers

La thérapie génique dérange, interroge. Pourquoi? Tout d'abord parce qu'elle a connu des échecs fortement médiatisés, comme le cas du patient américain J.Gelsinger en 1999 qui ont terni son image au moment même où elle se mettait réellement en route. De nombreux paramètres expliquent l'inefficacité relative de la thérapie génique chez l'Homme: incapacité des vecteurs à modifier un pourcentage important de cellules, difficulté de créer des vecteurs reproduisant les cinétiques complexes d'expression des gènes, etc. Cette inefficacité rend forcément plus aiguës les considérations éthiques, sociologiques et sécuritaires.

L'expérimentation en elle-même pose également des problèmes éthiques, qu'elle se fasse sur le corps humain ou sur des modèles animaux. La société actuelle semble considérer que l'expérimentation réduit le patient à un simple outil de travail, voire à un objet. Afin d'éviter toute dérive, il est primordial d'encadrer tous les essais cliniques d'une législation et de contrôles, mais aussi de rendre des comptes au public.

Comme toute biotechnologie, la thérapie génique soulève des considérations d'ordre financier. Aujourd'hui essentiellement financée par le gouvernement, les associations publiques caritatives et/ou les industriels, la thérapie génique, encore trop expérimentale, n'en est pas à exister sur le marché du commerce. Nombreux sont ceux accusant la thérapie génique d'aggraver les difficultés de financement de la recherche scientifique pour n'aboutir qu'à un bilan très mitigé au niveau de sa réussite médicale et commerciale. Considérée comme une thérapeutique de pays riche, son utilité est parfois lourdement remise en question.

Enfin, à une période où les organismes génétiquement modifiés (OGM) sont d'actualité, il est rapide de faire l'amalgame avec la thérapie génique. En effet, le risque d'eugénisme lié à sa pratique existe potentiellement. Néanmoins, le Comité Consultatif National d'Ethique (CCNE) a demandé l'interdiction formelle de la thérapie génique à un niveau germinale chez l'Homme, ainsi que l'utilisation de certains produits susceptibles de provoquer des modifications des caractères physiques et/ ou psychiques des patients. En parallèle de la crainte associée à la modification génétique des êtres vivants, réside celle du risque de résurgence de certains virus utilisés comme vecteurs lors des essais cliniques. Ce risque est pratiquement inexistant et les effets secondaires, s'ils restent dramatiques au niveau humain, sont globalement rares.

Les diverses instances impliquées dans le contrôle des essais en thérapie génique, ainsi que la législation actuelle, adoptent des cadres réglementaires permettant une protection optimale du patient et de son entourage et un respect des méthodes et des démarches en expérimentation.

b – Aspects législatifs et réglementaires de la thérapie génique

Le développement de la thérapie génique dans les années 90 est intervenu au même moment en France que les crises successives du sang contaminé, de l'hormone de croissance et de la "vache folle". Elles ont mené vers la nécessité d'encadrer les différentes étapes de cette biotechnologie nouvelle utilisant des produits d'origine animale ou humaine à des fins thérapeutiques. Cette prise de conscience s'est donc élargie à des produits n'étant pas classiquement considérés comme des médicaments, tels les produits cellulaires ou les tissus. [27].

Nous traiterons tout d'abord de la réglementation française actuelle sur la thérapie génique dans ses grandes lignes, avant de la comparer avec celle des pays voisins.

b1 - La réglementation française

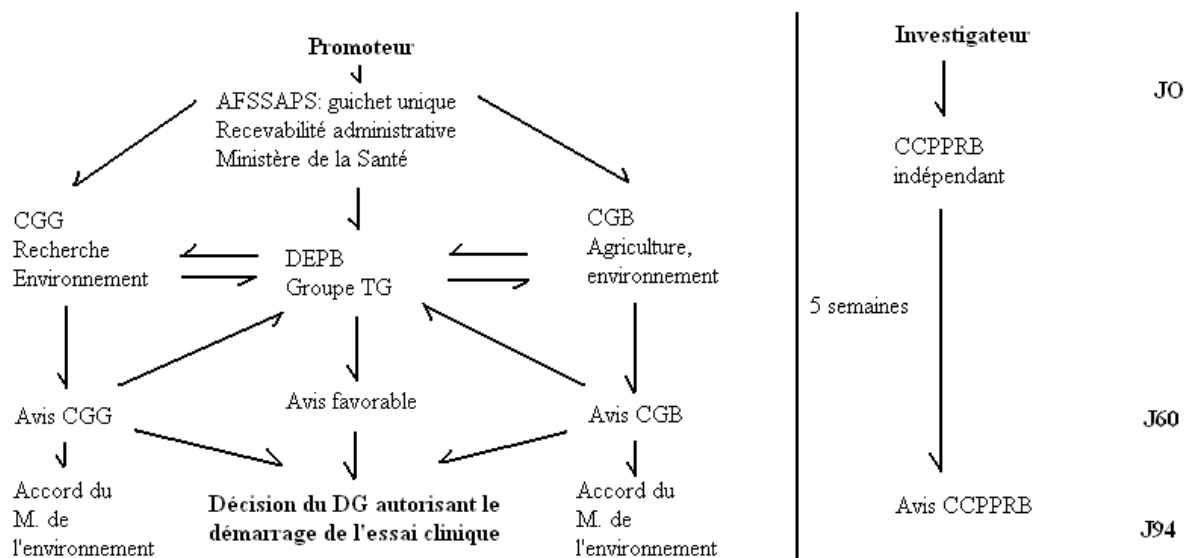
Elle s'envisage à deux niveaux: celle relative aux essais cliniques, partie expérimentale proprement dite et la seconde qui traite de la mise sur le marché des produits de thérapie génique.

- Procédure d'autorisation d'un essai clinique de thérapie génique

La loi du 28 mai 1996 pose les bases réglementaires concernant l'autorisation préalable au commencement de tout essai clinique, l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) étant l'unique autorité compétente à délivrer un consentement définitif. Elle précise également quels établissements sont autorisés à accueillir des essais de thérapie génique, et quels produits à être utilisés. Le décret de cette loi prévoit un délai de 90 jours avant le rendu d'une décision par le Directeur général de l'AFSSAPS.

Le diagramme décisionnel présenté (figure 30) montre que différentes instances, passant essentiellement par les ministères de l'Environnement et de la Santé, permettent à un projet d'essai clinique de voir le jour ou non. Ainsi, un dossier unique déposé par le promoteur passe dans les mains de trois autorités, à savoir le CGG (Comité de génie génétique), le CGB (Commission d'étude de la dissémination des produits issus de génie génétique) et l'AFSSAPS. Cette dernière retourne alors au promoteur les recommandations et avis concernant stockage, transport et mesures de confinement pour le patient. Le directeur de l'AFSSAPS donnera, pour finir, sa décision sur l'avenir du projet.

Figure 30: Procédure d'autorisation d'un essai clinique de thérapie génique [27].



Les essais cliniques sont également soumis à la réglementation OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) - qui résulte de la traduction en droit français des directives européennes déjà existantes (non détaillées ici) - ainsi qu'à la loi Huriot-Sérusclat. Cette loi n°88 du 20 décembre 1988, réactualisée depuis, encadre les recherches biomédicales dans le domaine éthique en imposant d'identifier clairement le promoteur de la recherche afin de pouvoir déterminer ses responsabilités. Elle demande en outre aux laboratoires d'exposer leurs objectifs et les risques liés aux expérimentations prévues. Enfin, elle protège les animaux ou personnes sur lesquels l'essai sera effectué, en imposant l'intervention d'un investigateur du CCPPRB (Comité contre la protection des personnes se prêtant à une recherche biomédicale) avant toute mise en route du projet. Celui-ci contrôle les paramètres propres à la sécurité, l'efficacité, la qualité et l'acceptabilité éthique du projet de recherche et rend un avis dans un délai inférieur à cinq semaines. Dans le cadre de travaux sur des patients humains, un consentement éclairé des objectifs et risques de la recherche est également demandé.

Une dernière loi, bioéthique comme la loi Huriet, s'applique à la thérapie génique sur l'Homme afin de préserver le respect du corps humain: elle proscrit d'une part tout travail sur des cellules germinales et par conséquent tout risque d'eugénisme, et n'autorise l'atteinte à l'intégrité du corps qu'en "cas de nécessité thérapeutique pour la personne" (Articles 16-3 et 16-4 de la loi du 29 juillet 1994).

Ainsi, l'AFSSAPS a permis un allègement des démarches de demande et de validation des essais cliniques depuis 1995, en coordination avec les différents ministères impliqués. L'application des lois présentées, ainsi que l'enquête menée par ces derniers, sont la base requise pour une éventuelle mise en route d'un essai clinique de thérapie génique.

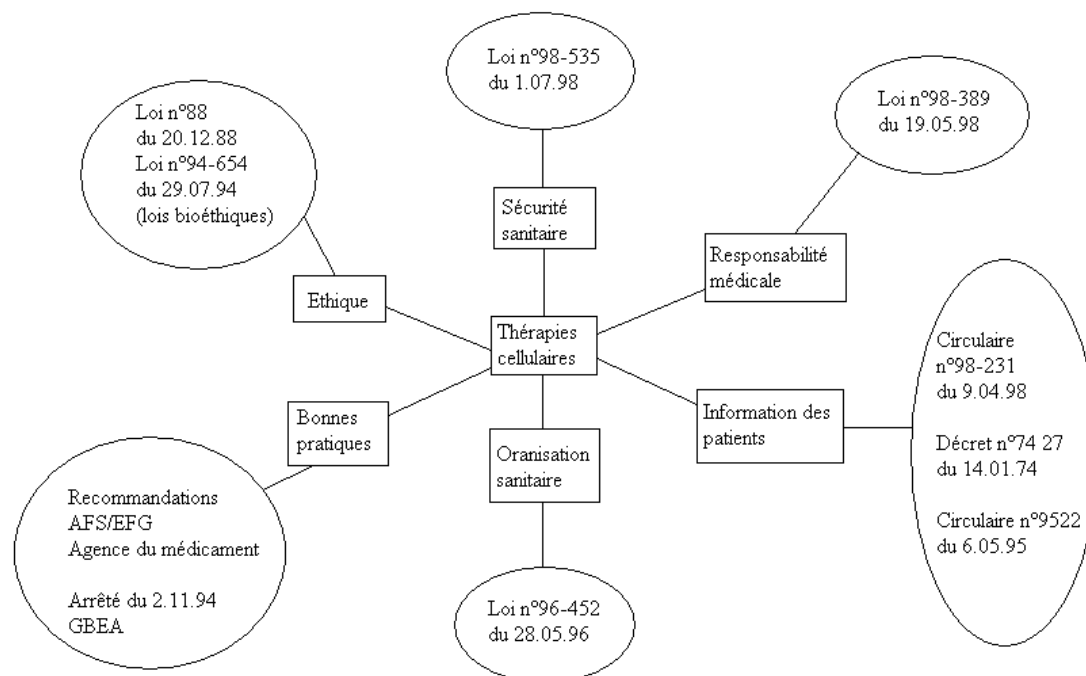
- Réglementation française des produits de thérapie génique

La législation française prévoit que les produits de thérapie génique (PTG) puissent être considérés comme des spécialités pharmaceutiques - et donc subir la réglementation qui y est associée - ou non selon le cas: pour un produit destiné à être commercialisé à grande échelle, une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) sera requise; tandis qu'un vecteur destiné à traiter des maladies rares par exemple, donc développé pour un petit nombre, pourra échapper à la qualification de "spécialité pharmaceutique" et subira une réglementation spécifique aux PTG. Cette dichotomie est énoncée par la loi du 28 mai 1996 (article L.676-3, modifié par la loi du 1^{er} juillet 1998), qui catégorise un PTG selon son utilisation future. C'est ainsi qu'un produit peu développé pourra échapper au système européen de procédure centralisé pour l'octroi de son autorisation; ce PTG sera alors autorisé par l'AFSSAPS (mesure nationale).

D'autre part, l'article L.511 de la loi du 28 mai 1996 considère tous les PTG comme des médicaments, puisqu'ils sont administrés pour prévenir, diagnostiquer ou traiter une maladie. Ils doivent donc, avant leur utilisation, avoir fait la preuve de leur sécurité d'emploi et de leur efficacité clinique; cette assurance passe par le recours aux essais cliniques évoqués précédemment [27].

C'est enfin cette même loi qui n'autorise la production des PTG et leur administration que dans des établissements agréés, soit par l'Agence du Médicament, soit par le ministre chargé de la santé selon que ces produits sont ou non des spécialités pharmaceutiques. Au final, de telles activités ne peuvent avoir lieu que dans des établissements de santé publique ou de transfusion sanguine agréés par le Ministère de la Santé [27] (figure 31).

Figure 31: Bilan: Encadrement législatif et réglementaire des essais cliniques et des produits de thérapie génique [27].



Pour résumer, lorsque les essais cliniques sont achevés et ont permis de prouver l'efficacité d'un produit de thérapie génique, une mise sur le marché peut être envisagée. La réglementation concernant cette dernière étape prévoit alors deux statuts pour les PTG (spécialité pharmaceutique ou non). Le PTG devra, dans les deux cas, renseigner les mêmes items que pour un médicament classique, à savoir: qualité, sécurité et efficacité.

Elles ne seront pas détaillées ici, mais il est important de noter les mesures prises par l'Europe et les Etats-Unis puisque, comme vu précédemment, ce sont eux qui comptabilisent le plus d'essais cliniques en cours dans le domaine de la thérapie génique.

- En Europe

En tant que biotechnologie faisant appel à la stratégie dite de l'ADN recombinant, la thérapie génique est régie par une procédure "centralisée" concernant ses produits, lorsque ceux-ci sont considérés comme des spécialités pharmaceutiques (éléments de la liste A). Ce n'est en effet qu'après acceptation du dossier par le Comité européen des Spécialités Pharmaceutiques (CSP), puis par la Commission Européenne, que l'AMM pourra être délivrée. Il n'existe par contre encore aucun texte réglementaire concernant les essais cliniques à l'échelle européenne [27]. Leur encadrement est donc régi par des réglementations nationales, comme nous l'avons vu plus haut. La France fait partie d'un petit groupe de pays européens – avec la Grande-Bretagne et l'Italie essentiellement – ayant réussi à mettre en place un système un peu plus spécifique que la seule procédure relative aux OGM.

A noter la possibilité pour certains PTG d'être considérés comme "médicaments orphelins": la thérapie génique concerne de nombreuses maladies génétiques rares qui par conséquent ne suscitent pas l'engouement de la recherche ni des industriels. Les patients atteints de ces maladies pâtissent de ce désintérêt, si bien que l'Europe a songé à définir ces médicaments orphelins et à leur conférer certains avantages pour pallier à cette injustice. En effet, pour une "maladie pour laquelle le médicament est indiqué est rare (moins de 5 cas/10000 habitants en Europe), et ne bénéficie pas d'alternative thérapeutique", et pour laquelle "il est peu probable qu'en l'absence d'incitation, la commercialisation de ce médicament [...] génère des bénéfices suffisants pour justifier l'investissement nécessaire" [27], un certain nombre d'avantages est envisageable. Ces derniers concernent la production du PTG en question: moindre coût, allègement des démarches administratives...Ce statut de médicament orphelin a donc pour objectif de favoriser le développement de la thérapie génique dans des indications de maladies rares.

- Aux Etats-Unis

Avec actuellement 66% du nombre total d'essais cliniques en cours, les Etats-Unis ont été les pionniers de la recherche en thérapie génique. En est-il de même de leur réglementation dans ce domaine?

Le décès du patient américain précédemment cité, en 1999, a été expliqué par un manque évident de moyens plus que par une absence véritable de lois, qui ont permis aux chercheurs de commettre de multiples fautes concernant les règles de base des tests sur l'Homme. Malgré la présence de nombreuses administrations telles que le National Institutes of Health (NIH), ainsi que des services de contrôle performants, il semblerait que les Etats-Unis aient péché par leur manque d'organisation et de moyens [106]. Depuis 2000 cependant, un effort global est fait pour renforcer ces différents services, en particulier sur le déroulement des essais cliniques, l'efficacité des contrôles effectués, mais également sur la communication entre les différentes administrations - notamment entre le FDA (*Food and Drug Administration*) et le NIH. Pour finir, il est envisagé d'avoir recours à des amendes distribuées aux fraudeurs, ce qui serait une alternative à l'arrêt complet des essais en cours.

Ainsi, le recours à la thérapie génique, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, répond à de multiples exigences administratives encore spécifiques à chaque pays, aussi bien du point de vue de l'expérimentation en elle-même que de la commercialisation à venir du fruit de ces recherches. Ces mesures sont indispensables, non seulement pour assurer la protection des patients, modèles animaux, chercheurs et de toutes les personnes en contact avec les produits de thérapie génique, mais aussi pour permettre à cette biotechnologie, révolutionnaire sur bien des points, d'effacer la méfiance et le scepticisme de l'opinion public.

En raison des lois bioéthiques, la réglementation chez l'animal comme par exemple chez le Chien est bien moins lourde que chez l'Homme et autorise des expériences plus invasives démarrées pour certaines il y a quelques années déjà.

II – LE MODELE CANIN EN THERAPIE GENIQUE

Le Chien est resté pendant longtemps à l'écart des activités de recherche, mais on assiste depuis quelques années à une prise de conscience des multiples intérêts que peut présenter le Chien domestique, *Canis familiaris*, en tant que modèle biologique.

Nous étudierons dans un premier temps les originalités génétiques des canidés, et plus particulièrement du chien d'aujourd'hui. Les maladies génétiques qui l'affectent ainsi que ses caractéristiques physiologiques ont mené les recherches vers l'analyse du génome canin, que nous envisagerons en dernier lieu de cette première partie.

A – Données récentes de génétique canine

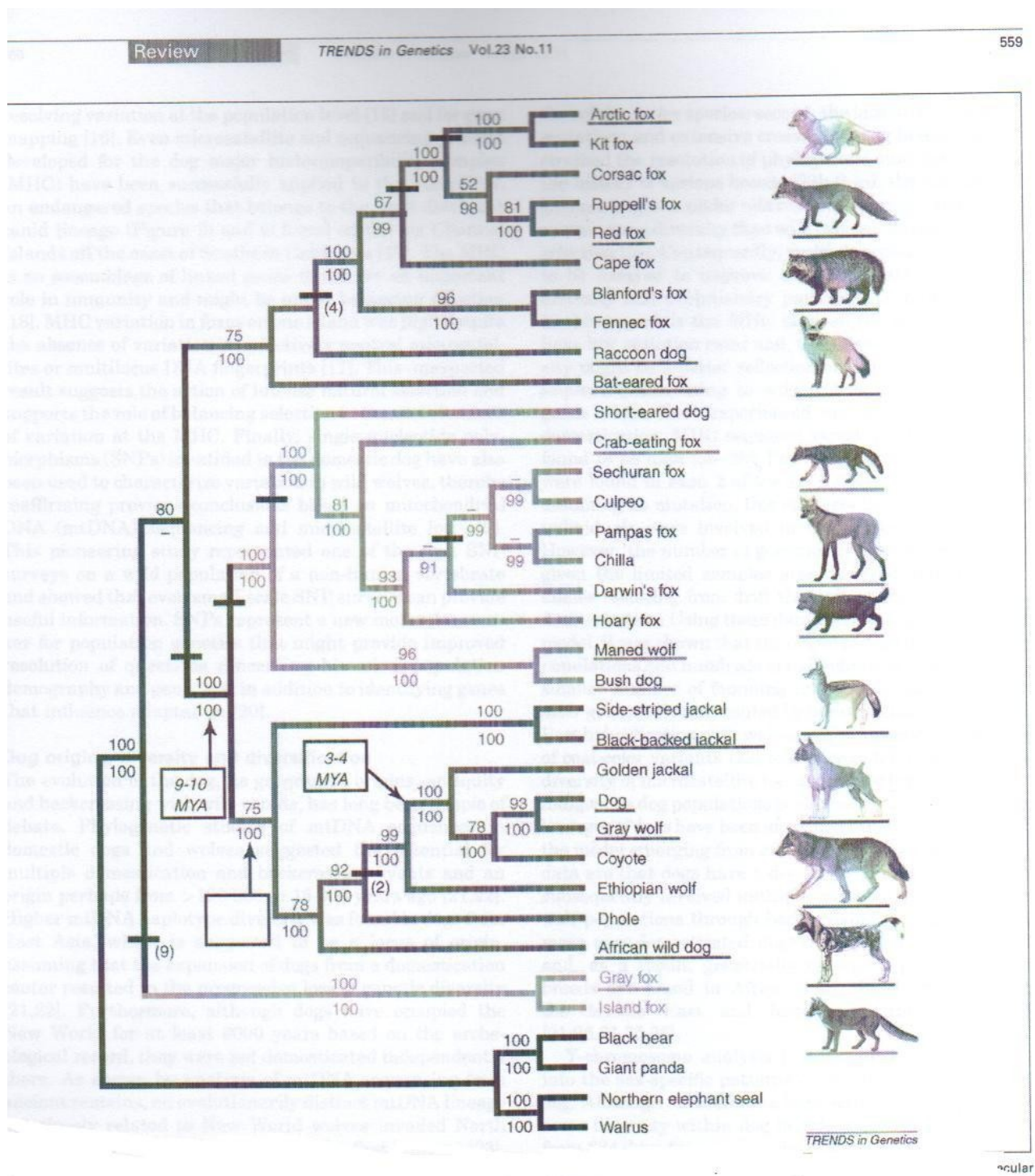
Tous les chiens modernes proviendraient de la domestication des loups, il y a environ 15000 ans, et seraient issus d'un nombre limité de loups femelles d'Asie orientale [26]. Les quelques 350 races aujourd'hui répertoriées seraient le fruit d'intenses sélections et croisements effectués par l'Homme, faisant de chacune d'entre elles un isolat génétique. Cependant, toutes réunies, elles offrent un ensemble inégalé de diversité phénotypique, conférant au chien son statut de modèle irremplaçable.

1 – Origine des canidés et diversité génétique

Le chien domestique est l'espèce dont l'évolution est la plus récente parmi la famille des canidés [90]. Les données actuelles sur l'origine commune de l'espèce canine *Canis familiaris* à partir du Loup sont en adéquation avec les précédents travaux de J.CLUTTON-BROCK publiés en 1995 [34]. Des résultats préliminaires de comparaison de séquences de 70 fragments d'ADN génomique [45], représentant 25 kilobases, entre vingt chiens, deux loups et deux renards ont montré que la divergence entre le Renard et les chiens et loups est de l'ordre de 1%, alors que la divergence entre le Loup et le Chien n'est que de 0,1%, c'est-à-dire de l'ordre de la variation intra - espèce (S.PAGET, données non publiées, [45]). Les chiens font partie de la même superfamille que les ours, fouines, rats laveurs, phoques...dont ils ont divergé très tôt contrairement à ces derniers. C'est à cause de la précocité de cette divergence au sein des carnivores que le Chien et ceux-ci n'auraient en commun que des séquences dont les régions ont connu une évolution lente [90].

Différentes opinions sont apparues chez les auteurs s'étant intéressés au sujet lorsqu'il s'agit de dater plus précisément le début de la domestication de ces loups par l'Homme (estimée à 12 000 – 15 000 avant J.C.) [28, 32], ou encore d'établir les sites géographiques de cette domestication et la probable contribution d'autres espèces du genre *Canis* à la création du Chien que l'on connaît aujourd'hui (figure 32).

Figure 32: Phylogénie de la famille des Canidés [106].



C'est grâce à l'analyse de l'ADN mitochondrial de différentes espèces du genre *Canis* et leur comparaison qu'il a été possible, d'après Francis Galibert et al. [45], de réfuter l'hypothèse émise par Charles Darwin et d'autres scientifiques tels que Konard Lorentz [90] selon qui la diversité phénotypique constatée chez le Chien tenait à ses origines multiples. L'ADN mitochondrial offre de nouvelles perspectives sur la compréhension de l'évolution des espèces puisque le génome mitochondrial n'est transmis que par la mère. De plus, puisque le génome mitochondrial ne se recombine pas, l'analyse phylogénique des séquences d'ADN mitochondrial définit un arbre haplotypique unique. Les analyses ont montré que l'espèce *Canis familiaris* proviendrait uniquement d'un nombre restreint de Loups femelles et donc d'un pool limité d'allèles de Loups de l'Est asiatique [54]. Ce serait la domestication et l'expansion du Chien en Europe, en Asie et vers le Nouveau Monde aux côtés de l'Homme, durant lesquelles des mutations se seraient produites, qui ont abouti à l'extrême variation phénotypique actuellement observée. De telles mutations ont été suspectées rares, puisque selon Hartl et Clarck (1997), leur taux dans l'espèce canine avoisine 10^{-5} par gène et par génération [90]. A l'inverse, des études récentes portant sur l'ADN nucléaire [34], et en particulier sur la région génomique du complexe majeur d'histocompatibilité chez des chiens et des loups, ont expliqué la création des chiens actuels par l'intervention de plusieurs populations et de centaines d'animaux, comprenant les autres espèces du genre *Canis* comme le Coyote ou le Chacal par exemple. En effet, les espèces du genre *Canis* ont toutes le même caryotype (39 paires de chromosomes), et leur croisement semble pouvoir donner des descendants fertiles. [67]. Ainsi, il semblerait que les chiens aient une origine est asiatique ayant impliqué différentes populations, puis que la domestication les ait conduit vers l'Afrique, l'Asie, l'Australie, le Moyen-Orient, créant ainsi des races et des populations génétiquement divergentes [120].

Ces différences de résultats reflètent l'état actuel des recherches, qui restent encore fragmentaires. Cependant elles sont unanimes quant au rôle et à l'impact exercé par la domestication dans la sélection des caractères anatomiques et comportementaux reconnus dans les quelques 350 races de chiens actuellement répertoriées par la fédération cynologique internationale.

Il est difficile d'imaginer que l'expression du matériel génétique d'une seule espèce, et donc d'un seul génome, puisse donner des différences phénotypiques aussi extrêmes que celles observées entre un Yorkshire Terrier par exemple et un chien de race géante comme le Dogue Allemand. La diversité des gabarits chez le Chien est plus grande que pour n'importe quel autre mammifère, et dépasse même celle retrouvée au sein de la famille des canidés. Ceci tient à la fois à la domestication du Loup par l'Homme pour répondre à des critères de sélection différents (chiens

pour la chasse, la garde, le portage...), mais aussi aux récentes pratiques d'élevage et de sélection [120]. L'explosion des races canines au cours des deux derniers siècles représente une des plus formidables expériences génétiques jamais conduite par l'homme [90]. En effet, l'utilisation quasi-systématique des mêmes étalons "champions" afin d'exercer une sélection forte de certains phénotypes recherchés de façon spécifique pour chaque race, a contribué à la création d'autant de races. En revanche, cette extrême diversité laisse supposer que, à l'inverse du nombre très réduit de femelles à l'origine de l'espèce, le nombre de mâles a certainement dû être beaucoup plus grand lors de la domestication du Loup, afin d'enrichir le pool d'allèles utilisé bien plus tard par les éleveurs pour standardiser leurs races.

De récentes analyses [45] sur la diversité génétique de 85 races, réalisées à l'aide de marqueurs génétiques de type microsatellites, ont montré que les races peuvent être regroupées en 4 classes, en parfaite corrélation avec leurs origines géographiques, la morphologie et le rôle du chien dans les activités humaines.

Ainsi, la domestication du chien et la création par l'Homme de plus de 350 races a fourni une extrême diversité phénotypique et comportementale, mais a également eu un impact incontestablement négatif sur la santé des animaux en les prédisposant à certaines maladies génétiques héréditaires [44].

2 – Les maladies génétiques chez le Chien

Il a fallu attendre les années 1990 pour qu'un groupe américain de l'Université de Berkeley expose et propose que le Chien, avec toute sa diversité morphologique, comportementale et de sensibilité aux maladies génétiques, puisse être une espèce remarquable pour mieux comprendre le rôle et la fonction de nos gènes. En effet, le Chien et l'Homme partagent pratiquement tous leurs gènes (voir plus loin). Ces gènes ne sont certes pas organisés de la même manière sur les chromosomes, mais ils codent pour les mêmes protéines et leurs dérèglements entraînent souvent les mêmes maladies génétiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, la domestication du Chien et la création par l'Homme de très nombreuses races ont permis une extrême diversité phénotypique, mais ont eu aussi malheureusement un impact très négatif sur la santé des animaux, en concentrant involontairement des allèles morbides ou des combinaisons non adéquates d'allèles. Ainsi, plus de 60 races de chiens ont des problèmes auditifs, comme les Dalmatiens chez qui près de 30% des individus sont atteints [22]. Une centaine de races sont sévèrement touchées par les atrophies

progressives de la rétine, équivalentes des rétinites pigmentaires humaines [107]. On comprend alors que la création d'autant de races s'est faite par une sélection d'allèles de gènes donnés, répondant à la sélection demandée par des caractères externes (poil, taille, couleur de robe, taille de la queue, aptitudes, caractère...) mais aussi entraînant la sélection d'allèles de gènes physiquement proches sur le chromosome des allèles sélectionnés, qui peuvent correspondre à des allèles de prédisposition à des maladies ou à d'autres phénotypes. Cette co-sélection involontaire d'allèles délétères pose trois problèmes majeurs pour les races et la santé des chiens: le premier est que, compte tenu des pratiques d'élevage, si les chiens atteints ou porteurs sont des "champions", la mutation non désirée au départ se propage dans la race, de façon d'autant plus rapide et grave que les mêmes champions sont fréquemment mis à la reproduction et que l'effectif de la race est petit. Le deuxième problème est que pour les maladies ou les caractères à déclaration tardive, les animaux atteints ne peuvent pas être éliminés dès leur naissance, n'étant pas cliniquement symptomatiques. Le troisième et dernier écueil est que pour les maladies ou caractères récessifs, les porteurs sains (chiens hétérozygotes) ne se "repèrent" pas non plus car ils n'expriment pas le phénotype, et ces chiens cliniquement sains sont porteurs de l'anomalie génétique, qu'ils transmettent à leur descendance.

Après l'Homme, le Chien est l'espèce qui bénéficie de la meilleure surveillance médicale: plus de 400 maladies génétiques sont recensées chez le Chien [44]. La base de données du site OMIA (*Online Mendelian Inheritance in Animals*) (tableau 2) contient la liste des maladies et des caractères d'intérêt pour lesquels une transmission héréditaire monogénique (un seul gène est alors responsable de l'affection, et la ségrégation est dite mendélienne; cette transmission peut être récessive ou dominante) a été découverte chez le Chien, et en dénombre 122. Parmi ces derniers, 58 ont été caractérisés au niveau moléculaire. Enfin, sur le total des 482 maladies et caractères d'intérêt recensés par cette base de données, 220 ont été retrouvés chez l'Homme et trouvent en la race canine un outil précieux de recherche. Donald F. Patterson écrit en 2000 que la fréquence des maladies induites par l'environnement, telles que celles rencontrées en médecine générale, décline, tandis que celle des maladies d'origine génétique ne fait qu'augmenter [94]. Selon ce même auteur, 5 à 10 nouvelles maladies génétiques canines sont découvertes par an, et le mode de transmission n'est connu que pour 55% du total des maladies recensées. Enfin, une étude de M. Switonski et al. [113] a montré que pas moins de 50% des maladies héréditaires chez le Chien sont spécifiques d'une race.

Tableau 2: Maladies génétiques et caractères d'intérêt animaux répertoriés en 2007 [106].

	Nombre total de maladies et caractères d'intérêt	Maladies monogéniques	Maladies et caractères caractérisés à l'échelle moléculaire	Potentiels modèles pour des maladies humaines	Potentiels modèles pour des maladies chez d'autres espèces
Chien	482 (19%)	123 (23%)	59 (28%)	220 (22%)	279 (16%)
Vache	370	67	37	122	228
Chat	277	45	17	133	213
Porc	214	34	13	70	149
Cheval	189	30	14	95	133
Mouton	188	69	16	68	132
Poule	177	70	19	36	70
Chèvre	70	10	7	25	59
Lapin	49	13	3	29	39
Rat norvégien	37	4	2	15	27
Faisan japonais	36	22	4	13	16
Autres	456	58	21	184	394
Total	2545	545	212	1010	1739

Ces chiffres prouvent l'importance des maladies génétiques chez le Chien. Leur étude et leur compréhension, indispensables à la compréhension des maladies homologues de l'Homme, passent généralement par la localisation du ou des gène(s) défectueux.

3 – Les différents modes de transmission des maladies génétiques [64]

a – Hérité mendélienne et hérédité multifactorielle

Le modèle héréditaire le plus simple est la transmission d'une anomalie due à un seul gène : la transmission monogénique ou mendélienne. L'étude du pedigree permet alors, en général, de comprendre la transmission de l'anomalie.

Un défaut dû à un gène unique est donc qualifié de « mendélien ». Un animal peut être homozygote ou hétérozygote au locus du gène. Le modèle de transmission dépend alors de deux éléments : du fait que la mutation se situe sur un autosome ou sur un gonosome (lié au sexe) et du fait que le caractère soit dominant (dès que l'un des chromosomes de la paire porte un allèle défectueux) ou récessif (exprimé seulement lorsque les deux chromosomes portent un allèle défectueux).

Une autre catégorie de maladies pour lesquelles une origine génétique est reconnue résulte de l'action non pas d'un seul mais de plusieurs gènes (hérédité polygénique ou multifactorielle). Au lieu de la mise en cause d'une erreur, dans un gène, ce sont plusieurs variations mineures dans l'information génétique, associées à des facteurs environnementaux, qui entraînent ou prédisposent à la maladie.

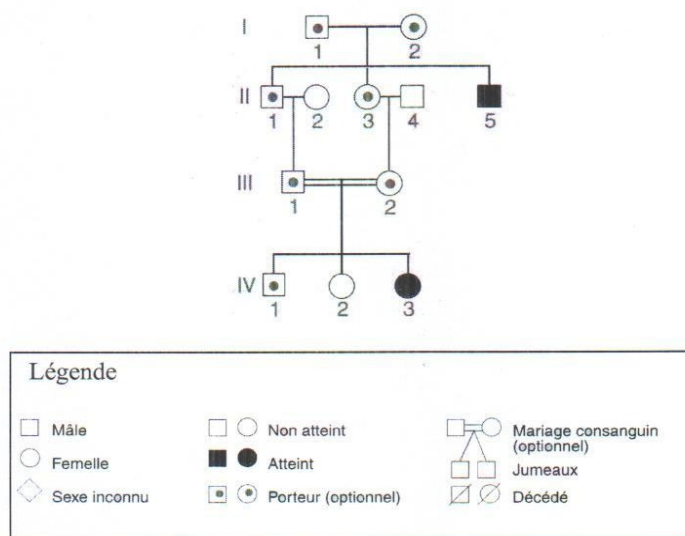
Ces maladies, fréquentes dans les populations humaines ou animales, sont très difficiles à étudier du fait du nombre élevé de gènes impliqués et de leurs interactions entre eux et avec l'environnement.

b – Transmission autosomique récessive

Les mâles et les femelles sont atteints dans les mêmes proportions et les parents des animaux malades, s'ils ne sont pas eux même malades, sont hétérozygotes et sont appelés porteurs sains ou obligatoires. L'accouplement de deux porteurs sains produit en moyenne un quart de mâles et de femelles d'une portée, touchés par la maladie. L'accouplement d'un porteur sain et d'un malade, produit en moyenne la moitié de la portée de malades (mâles et femelles confondus). Les individus malades (forcément homozygotes) accouplés entre eux ne donnent que des individus malades.

Enfin, dans une population donnée, de nombreux individus peuvent être porteurs sains. L'usage d'accouplements consanguins, dans cette population, entraînera une augmentation de la fréquence de la maladie (figure 33).

Figure 33: Le mode de transmission autosomique récessif [64].



c – Transmission autosomique dominante

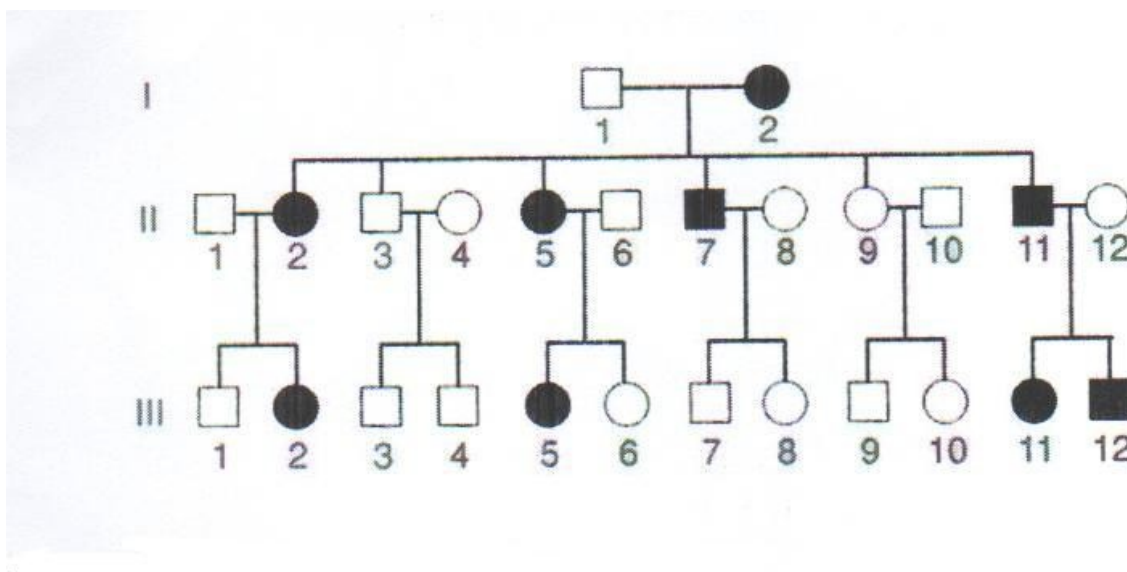
Mâles et femelles sont atteints dans les mêmes proportions et la maladie apparaît en général à chaque génération. Un individu atteint a en principe au moins un de ses parents atteint. Les mâles autant que les femelles sont aptes à transmettre la maladie à un mâle ou une femelle. Parce que les

individus atteints sont généralement hétérozygotes (l'état homozygote dans le cas des maladies dominantes est souvent létal), l'accouplement d'un atteint et d'un sain donne une portée dont la moitié de la descendance est atteinte (figure 34).

Généralement, chez un individu hétérozygote, un seul des deux allèles s'exprime : c'est l'allèle dominant, l'allèle récessif ne s'exprime pas, l'animal présente les symptômes de la maladie, on dit que la pénétrance est complète. Dans certains cas, la pénétrance est incomplète c'est-à-dire qu'un individu hétérozygote, qui devrait être malade, ne l'est pas. Il n'exprime pas son génotype. En revanche, il transmet à la moitié de sa descendance l'allèle responsable de la maladie. Sa descendance pourra elle exprimer les symptômes de la maladie.

La pénétrance incomplète est un phénomène très fréquemment observé dans le cas des maladies autosomiques dominantes. Il complique beaucoup l'étude des arbres généalogiques de ces maladies.

Figure 34: Le mode de transmission autosomique dominant [64].



d – Transmission liée au sexe

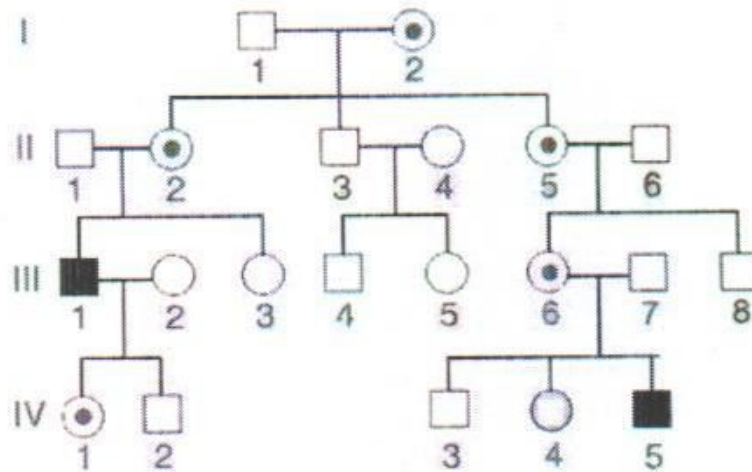
- Mode de transmission récessif lié à l'X

On observe généralement beaucoup plus de mâles que de femelles malades. Lorsque des femelles hétérozygotes, appelées porteuses saines ou conductrices, sont accouplées avec des mâles

sains, la moitié des mâles de la portée sont atteints et la moitié des femelles sont des porteuses saines (phénotypiquement normales), tandis que l'autre moitié des mâles et des femelles seront sains (ne portant pas l'allèle muté). Le gène mutant, porté par le chromosome X, n'est jamais transmis du père aux mâles de la portée (qui reçoivent du père le chromosome Y), mais est transmis à toutes ses filles par un mâle affecté (figure 35).

On obtient des femelles malades (homozygotes pour la mutation) uniquement si l'on croise une femelle porteuse avec un mâle malade. Ce cas de figure étant relativement rare, peu de femelles sont atteintes de maladies récessives liées à l'X.

Figure 35: Le mode de transmission récessif lié à l'X [64].

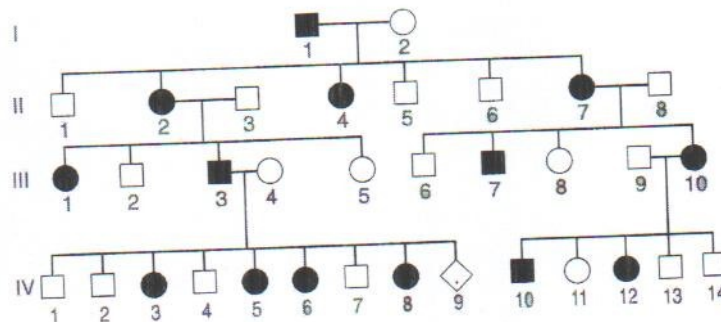


- Mode de transmission dominant lié à l'X

Les deux sexes sont touchés mais les femelles plus souvent que les mâles. Par ailleurs, les troubles sont généralement moins sévères chez les femelles malades que chez les mâles malades.

Un individu né d'une femelle affectée a un risque de 50% d'être affecté, indépendamment de son sexe. Un mâle affecté transmet le phénotype à toutes ses filles, mais à aucun de ses fils (figure 36).

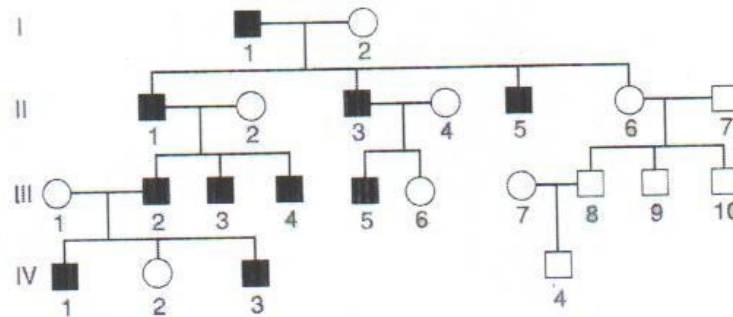
Figure 36: Le mode de transmission dominant lié à l'X [64].



- Mode de transmission lié à l'Y

Seuls les mâles sont atteints. Tous les mâles affectés ont un père affecté et tous les fils d'un mâle affecté sont affectés (figure 37).

Figure 37: Le mode de transmission lié à l'Y [64].



e – Le mode de transmission maternel

La transmission se fait exclusivement par les mères car la mutation responsable de la maladie se trouve sur l'ADN mitochondrial, où lors de la fécondation, seules les mitochondries de l'ovocyte sont conservées. Souvent, l'anomalie génétique n'est pas présente dans toutes les mitochondries

transmises à la génération suivante mais seulement dans une partie. Alors selon le taux de mitochondries mutées, la proportion de descendants malades varie dans les portées. De même, l'intensité de l'expression des symptômes peut varier d'un individu malade à l'autre. On parle alors d'expressivité variable.

L'analyse des différents modes de transmission des maladies canines a permis d'aboutir à la conclusion suivante: sur les 482 maladies ou caractères génétiques canins recensées par le site OMIA, la majorité se transmet selon le mode autosomique récessif (66%) [113]. Les maladies polygéniques quand à elles sont contrôlées par un nombre souvent inconnu de gènes. L'expression de ces derniers est de plus influencée par une multitude de facteurs environnementaux. Par conséquent l'héritabilité de telles maladies varie au sein même de chaque race ou de chaque population.

Ainsi, l'intérêt majeur du modèle canin en génétique, qu'aucun autre modèle animal n'est en mesure d'offrir, réside dans les multiples maladies héréditaires identifiées et pour lesquelles certaines races présentent des prédispositions particulières, suggérant des effets fondateurs. Ces maladies, aux tableaux cliniques généralement étonnamment similaires chez l'Homme, sont dues à des mutations affectant souvent des gènes homologues. C'est pourquoi, sur la base que le Chien pourrait représenter un modèle génétique prometteur pour la mise en évidence des relations entre génotype et phénotype, les chercheurs se sont engagés dans l'acquisition de connaissances sur son génome.

4 – Connaissance du génome canin

La connaissance de l'organisation du génome d'espèces d'intérêt est nécessaire pour des analyses génétiques plus poussées pour l'identification de gènes responsables de maladies héréditaires, les études génomiques comparatives et par la suite la mise en place d'essais thérapeutiques, en particulier de thérapie génique [113]. Depuis quelques années d'extraordinaires progrès ont été faits en cartographie du génome canin, motivés par les nombreuses perspectives que pourrait représenter le Chien comme modèle en génétique médicale.

Le génome du Chien est composé de 38 chromosomes (appelés autosomes) et des chromosomes sexuels X et Y; jusqu'à très récemment, aucune autre donnée n'était disponible pour cette espèce. En effet, les premières espèces à bénéficier de ces travaux ont été l'Homme et la Souris pour d'évidentes raisons pratiques et médicales. Dans un deuxième temps, de larges efforts

internationaux ont été réalisés pour développer et produire les cartes génomiques de nos animaux de compagnie que sont le Chien, le Chat et le Cheval [99].

Entre 1995 et 2005, des cartes canines contenant un nombre croissant de marqueurs ont été publiées [58], première étape à la construction de la cartographie génomique canine. C'est lors de la conférence d'Oslo en 1993 qu'il fut décidé de s'intéresser à la production de cartes canines. A cette époque, les trois principaux objectifs étaient : (1) développer une carte génétique canine avec des marqueurs espacés environ de 20 centiMorgan (cM); (2) établir une carte cytogénétique avec au moins deux marqueurs assignés à chaque chromosome, et (3) standardiser le caryotype canin. Les travaux sur la génétique canine, utilisant les méthodes de la génétique moléculaire, ont en réalité débuté il y a une dizaine d'années [76, 80], avec la publication de caryotypes du génome canin et sa standardisation par Switonsky et al en 1996 [46], ainsi que de premières cartographies du génome canin [45] par la mise en commun du travail de groupes américains et européens. Les premières cartes canines publiées furent des cartes d'hybrides d'irradiation. C'est ainsi que toute une collection d'hybrides a été produite [62] à partir de fibroblastes d'un chien croisé et que l'on a isolé et caractérisé 400 marqueurs canins (218 gènes et 182 microsatellites). L'intervalle moyen entre deux marqueurs sur cette carte était de 23 cR, soit une distance physique de 2,8 Mb (mégabases) [62, 63]. Une seconde carte publiée en 2000 [80] puis une troisième en 2001 [16] sont ensuite présentées avec, à chaque fois, un nombre croissant de marqueurs.

Guyon a publié en 2003 la dernière carte RH [50] qui, composée de 3270 marqueurs, ont permis une couverture quasi-complète pour tous les chromosomes et une résolution moyenne de 1 Mb. La même année a été publiée une carte à haute densité comprenant plus de 10 000 marqueurs correspondant à des gènes canins identifiés à partir d'un séquençage aléatoire, et pour lesquels les gènes orthologues (deux gènes sont orthologues s'ils sont homologues et déviés d'une spéciation) humains étaient tous identifiés. Résultat de la collaboration internationale, ce travail a cette fois –ci utilisé un nouveau panel d'hybrides d'irradiation plus résolutif (cellules canines irradiées à 9 000 rads) [67]. Une carte intégrée fut établie en compilant toutes les données obtenues par les différentes méthodes de cartographie : la FISH (hybridation *in situ* fluorescente), les cartes de liaison et d'hybrides d'irradiation [114]. Au final, plus de 90% des groupes RH ont été assignés [80] à des groupes de liaison résultant en la création d'une carte intégrée de plus de 724 marqueurs [121].

Un "livre blanc" rédigé à l'attention du *National Institute of Health* (NIH) en juin 2002, par la communauté scientifique intéressée par le modèle canin, a soulevé la question du séquençage du génome du Chien [89]. Trois arguments y étaient avancés, plaidant pour cette nécessité : (1)

l'interprétation de la séquence du génome humain, maintenant établie dans sa version définitive (version 34 , 10 mai 2004), nécessite la réalisation de nombreuses expériences de biologie qui doivent s'appuyer sur des prédictions et des hypothèses de travail compte tenu de l'importante "hétérozygotie" des populations humaines; seule la comparaison des séquences de plusieurs génomes de mammifères et d'espèces placées sur des branches phylogéniques différentes peut les produire. (2) Le Chien offre une diversité phénotypique et comportementale incomparable, dont il serait extrêmement intéressant de mettre en évidence l'origine en termes de gènes ou d'allèles. (3) Enfin, et ceci nous intéresse tout particulièrement ici, le Chien paye un très lourd tribut aux maladies génétiques simples et complexes; de ce point de vue, le Chien se positionne de façon différente et complémentaire par rapport aux autres modèles biologiques classiquement employés [45].

L'accumulation des connaissances sur le génome canin a alors été démultipliée grâce à un fort investissement du NIH qui, après avoir financé la construction de la carte génomique, s'est employé à séquencer intégralement le génome du Chien [34]. Un séquençage partiel à partir de l'ADN d'un caniche avait déjà été effectué aux Etats-Unis. Puis, le 7 décembre 2005, un séquençage complet du génome d'un boxer femelle nommée Tasha (figure 38) et sélectionnée pour son fort taux d'homozygote a été publié par le Whitehead Institute (Cambridge, MA, USA); celui-ci fut effectué sous la forme d'un *shotgun* (« whole genome ») d'une redondance de 7X [75, 105]. L'intérêt du choix d'un tel chien fut que, par son fort taux d'homozygote, on a réduit le plus possible les problèmes d'assemblage des quelques 35 millions de séquences produites. Il est apparu que le génome du Chien (2,4 Giga bases, Gb) est plus petit que celui de l'Homme (2,9 Gb). Cette différence est probablement due au plus faible pourcentage de séquences répétées (31% sur le génome canin, 46% chez l'Homme, et 38% chez la Souris). On a estimé qu'au moins 650 Mb de séquences d'ADN du génome canin coïncidaient de façon unique avec des séquences du génome humain, avec notamment des fragments de probables gènes orthologues pour 18 473 des 24 467 des gènes humains [67].

Figure 38: Tasha, première chienne boxer au génome séquencé. D'après Nicole Davis, du Broad Institute of MIT and Harvard.



L'annotation des gènes canins et la mise à disposition définitive de cette séquence a permis la caractérisation accélérée des causes génétiques de maladies et de caractères spécifiques chez le Chien, pour le Chien lui-même mais aussi pour la génétique médicale humaine. De plus, cette séquence, avec celles de l'Homme, de la Souris, du Rat et de la Poule, permet de poursuivre et d'améliorer l'annotation de la séquence du génome humain et des autres génomes d'espèces d'intérêt, pour répondre aux questions fondamentales sur l'évolution. C'est grâce à toutes ces études ayant mené à la compréhension de maladies génétiques au niveau moléculaire, que des tentatives de "réparation" des gènes défectueux ont pu être conduites. En effet, le principe de la thérapie génique repose sur l'identification du ou des gène(s) défectueux dans le but ultérieur de corriger ou compenser cette anomalie. Il est donc indispensable à toute étude de connaître préalablement les particularités du génome de l'espèce étudiée, tant du point de vue structural que fonctionnel (séquence des gènes, molécules induites...) [16].

B – Données de physiologie canine

La complexité du génome canin explique également son degré d'évolution au niveau physiologique. Mammifère carnivore, le Chien occupe un rang élevé dans l'évolution, du point de vue de son organisation anatomique et fonctionnelle. Il permet ainsi à ce modèle de mieux se rapprocher de la physiologie retrouvée chez l'Homme, aide précieuse à la compréhension des maladies ayant une répercussion commune dans les deux espèces. Nous envisagerons consécutivement le développement embryonnaire et post-natal du Chien, afin d'en dégager les analogies et différences avec l'espèce humaine. Nous verrons également que le système neuromusculaire et les organes des sens, cibles fréquentes de maladies génétiques, ont une physiologie relativement similaire à la fois chez le modèle canin et l'Homme, malgré des spécificités d'espèce. Enfin, il est utile d'évoquer les grands principes de fonctionnement du système immunitaire du Chien, puisque les réponses induites suite à un traitement par thérapie génique conditionnent l'expression du gène transféré, sa durée et son niveau d'efficacité.

1 – Le développement embryonnaire du Chien [35, 118]

Il est intéressant de connaître avant tout la progression du développement d'un point de vue morphologique afin de connaître l'origine des organes et de certaines maladies congénitales. Nous aborderons successivement : l'évolution de l'œuf fécondé avant son implantation dans l'utérus, la formation des annexes embryonnaires et enfin l'origine des organes et l'ordre d'apparition d'un certain nombre d'entre eux.

a - Premières étapes de l'évolution du zygote après la fécondation

La fécondation a lieu dans le tiers supérieur des trompes utérines. Après celle-ci a lieu la descente tubaire et l'arrivée du zygote dans l'utérus. La vie libre du zygote dans l'utérus précède la placentation. Chez le Chien, les embryons se répartissent de façon équidistante dans l'utérus avec une distribution identique dans les deux trompes grâce à la motricité du myomètre, elle-même sous contrôle hormonal.

A la suite de la fécondation vont avoir lieu une série de divisions extrêmement rapides de la cellule néoformée, durant lesquelles l'embryon entre dans l'utérus. De nombreuses modifications de position des cellules de l'embryon (la gastrulation) aboutissent à la formation d'une gastrula constituée de trois types de cellules répartis en feuillets qui donnent par la suite les tissus de l'embryon. Ces feuillets sont : l'endoderme (le feuillet le plus interne), l'ectoderme (feuillet le plus externe) et enfin le mésoderme situé entre les deux précédents. Dans le même temps commencent à se former les annexes embryonnaires (organes provisoires situés à l'extérieur du fœtus et qui

n'interviennent pas dans la formation de ses propres organes, mais qui assurent sa protection et sa nutrition ; à la naissance, les annexes sont abandonnées ou progressivement résorbées). Ce sont ces dernières qui permettent les échanges hormonaux entre la mère et l'embryon après l'implantation dans l'utérus.

Les annexes sont au nombre de trois. L'amnios est formé au 22^e jour, et forme la cavité amniotique qui contient un liquide stérile permettant la protection de l'embryon en amortissant les chocs pour le germe en voie de développement et en empêchant sa déshydratation. La vésicule vitelline, chez le Chien persiste durant toute la gestation. Ses rôles sont néanmoins limités. Enfin, l'allantoïde résulte d'une invagination dorso-ventrale de l'endoderme qui repousse le mésoderme. Elle est très développée chez le Chien. Sa formation est terminée le 18^e jour. Le mésoderme de l'allantoïde se vascularise et donne les vaisseaux sanguins du placenta qui sont reliés à la vascularisation de l'embryon. Le développement de ces vaisseaux permet la vascularisation du chorion qui développe des villosités. Il pénètre ainsi dans la muqueuse utérine. Ne subsiste ensuite entre le chorion et le sang maternel que l'endothélium des capillaires maternels au niveau duquel vont se faire les échanges entre le sang maternel et le sang fœtal.

On dit par conséquent que chez le Chien le placenta est de type endothélial-chorial. Comme les villosités sont réparties en une ceinture autour du sac embryonnaire, on dit que l'on a un placenta zonaire. A la parturition, il y a en conséquence une hémorragie. La partie de l'endomètre rejetée à ce même moment s'appelle la décidue ou caduque.

b - Formation des organes et conséquences sur les malformations

Pour mieux comprendre l'apparition de certaines malformations, il est important de connaître les périodes d'apparition des organes impliqués dans ces malformations au cours des soixante jours que dure le développement embryonnaire (figure 39).

Figure 39: Principales périodes critiques sensibles au cours du développement embryonnaire du Chien [35].

1 ^{er} -7 ^e jour	8 ^e -14 ^e jour	15 ^e -21 ^e jour	22 ^e -28 ^e jour 5-10 nm	29 ^e -35 ^e jour 20-35 nm	36 ^e -42 ^e jour 40-60 nm	43 ^e -48 ^e jour 80-100 nm	49 ^e -60 ^e jour 110-160 nm
L'exposition à des agents tératogènes à ces stades n'a soit aucun effet sur le développement des organes soit est létal pour l'embryon.							système nerveux central face cœur ceinture thoracique ceinture pelvienne yeux dents organes génitaux externes
Mort prénatale		Principales malformations morphologiques			Fonctionnement défectueux, anomalies morphologiques mineures		

2 – Les différents stades de la vie post-natale du Chien [65]

Tout comme l'Homme, le Chien présente, depuis la naissance jusqu'au stade sénior, différentes étapes de développement. Au niveau physiologique et comportemental, ces étapes sont au centre de modifications accompagnant la vie de l'animal. Depuis que le Chien est devenu un animal de compagnie à part entière, l'espérance de vie moyenne a augmenté de façon significative. L'accès à des soins de plus en plus poussés, les progrès effectués en médecine des carnivores domestiques, ainsi que la motivation croissante des propriétaires, ont permis l'apparition de la gériatrie canine au même titre qu'en médecine humaine.

Durant cette période l'activité du chiot est essentiellement centrée sur l'accès à la nourriture, et ses capacités psychologiques et motrices sont peu modifiées. Ensuite commence la période de transition marquée par un développement rapide des capacités cognitives, motrices et sensorielles. Avec l'apparition de l'ouïe vers l'âge de 3 semaines, les chiots entament une période de socialisation en explorant activement leur environnement proche ; ils commencent parallèlement à créer des relations sociales avec leurs congénères. Leur indépendance croît et vers 12 semaines ils entament leur période juvénile. C'est à ce moment que leur forte croissance leur autorise une exploration plus poussée de leur milieu et une prise d'indépendance plus marquée. Cette étape dure alors jusqu'à la maturité sexuelle.

a - La période néonatale

La période néonatale commence à la naissance, et dure approximativement 13 jours (entre 12 et 17 jours). Durant cette phase, le développement neurologique ainsi que le comportement des chiots sont les domaines les plus impliqués, avec l'acquisition de la nutrition entérale par la mère.

Un nouveau-né passe plus de 80% de son temps à dormir. Le sommeil profond n'est pas présent durant la période néonatale, les chiots dorment en présentant des mouvements spastiques (en particulier des muscles de la face et des membres). Leur comportement est largement déterminé par leur degré de satiété et de fatigue. Leurs déplacements n'ont pas de direction précise étant donné le faible développement de leurs capacités sensorielles. A noter que les chiots n'urinent et ne défèquent pas spontanément. C'est la mère qui, par léchage de la zone périnéale de sa progéniture, provoque miction et défécation.

b - La période de transition

Cette phase débute à l'ouverture des paupières (approximativement vers 2 semaines d'âge) et s'achève lors de l'apparition de l'ouïe (à trois semaines environ). Comme son nom l'indique, il s'agit d'une période de rapide transition entre le moment où les réponses néonatales diminuent et sont remplacées par des comportements plus adultes.

Pendant la transition le chiot devient plus réactif face à son environnement. Il gémit de moins en moins lorsqu'il a faim ou qu'il est séparé de sa fratrie, mais continue toutefois ses plaintes lorsqu'il se trouve dans un environnement qui ne lui est pas familier. Avec l'ouverture des paupières, le chiot commence à répondre à certains stimuli visuels. Les facultés motrices se développent et le chiot arrive enfin à se tenir sur ses quatre pattes et à marcher. Les mictions et défécations deviennent spontanées, et en fin de période de transition les animaux se déplacent en dehors du nid maternel pour faire leurs besoins. De plus, leur comportement alimentaire devient de plus en plus indépendant de la mère, et les chiots deviennent aptes à laper des substances liquides. Avec la sortie des premières dents en fin de période de transition, les chiots adoptent les premiers comportements de jeu entre eux et avec leur mère.

c - La période de socialisation

Une fois doté de vision et d'audition, le chiot commence à avoir des interactions sociales actives, à la fois avec ses congénères mais aussi avec l'Homme ou d'autres espèces. La hiérarchie s'établit et c'est durant cette période que la plupart des imprégnations sensorielles ont lieu. La période critique pour la socialisation se situe autour de 12 semaines d'âge. Il est alors essentiel

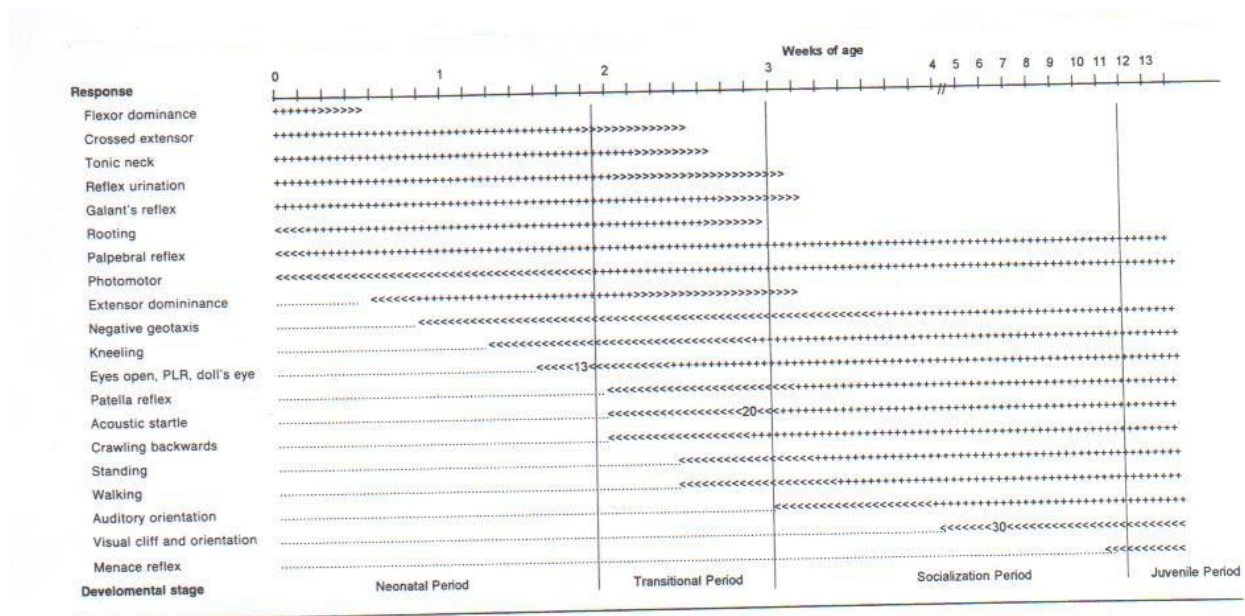
d'exposer les chiots à la présence de l'Homme et d'autres chiens, ainsi qu'à différents stimuli que l'animal sera susceptible de rencontrer une fois adulte.

Le chiot est sevré de sa mère vers 8 semaines. Malgré sa faible endurance, il continue de croître. Sa capacité à s'orienter et à répondre à des stimuli sonores s'affine. Le jeu devient le comportement dominant de la plupart et les relations hiérarchiques, même si encore instables, se mettent en place. Pendant la phase de socialisation, les chiots sont moins stressés d'être placés dans un endroit peu familier, les vocalisations diminuent parallèlement progressivement pour devenir minimales vers 12 semaines.

d - La période juvénile

Les chiots y développent la plupart des réflexes et postures de l'animal adulte. Le développement physique prend fin durant cette phase, qui s'achèvera au moment de la pleine maturité sexuelle, en moyenne vers 2 ans (figure 40).

Figure 40: Développement des réflexes et des réponses chez le Chien durant sa croissance [87].



Ainsi, le développement post-natal du Chien est comparable à celui retrouvé chez l'Homme, dans le sens où il permet la mise en place des repères sensoriels puis sociaux qui permettront la mise en place de relations hiérarchisées au sein d'un groupe. En cela, le Chien est un modèle rare qui permet d'étudier des maladies génétiques l'affectant lui et l'être humain à des périodes semblables de leur développement. Par exemple, l'apparition des cancers, généralement tardive,

pourra être analysée chez le Chien âgé. Ainsi, les résultats d'essais cliniques seront plus facilement transposables dans l'optique d'une application de traitement chez l'Homme (également d'âge avancé pour l'apparition de la plupart des cancers).

3 – Physiologie neuromusculaire et organes des sens [18]

a – Les muscles chez le Chien

Les muscles sont les principaux organes chargés du mouvement chez les animaux. Leur origine évolutive est très ancienne puisqu'on retrouve des cellules musculaires chez les coelentérés. Il existe plusieurs types de muscles ayant des fonctions différentes. Ainsi on distingue les muscles striés des muscles lisses dont l'organisation ultrastructurale est assez différente. Cette dichotomie est présente à la fois chez l'Homme et chez le Chien, ce qui constitue là encore un atout en ce qui concerne l'étude des maladies génétiques aux conséquences neuromusculaires. Nous en étudierons un exemple en troisième partie, en traitant de la myopathie de Duchenne chez ces deux espèces.

Même si le pourcentage de fibres musculaires dans chaque groupe musculaire varie entre l'Homme et le Chien, la répartition entre fibres rapides et fibres lentes est assez similaire. De même, les muscles lisses et striés sont généralement retrouvés dans des régions anatomiques analogues dans deux espèces. Les perspectives d'application de traitements de thérapie génique au niveau musculaire sont difficiles. En effet, le problème spécifique à ce tissu concerne son accessibilité pour les vecteurs utilisés à l'heure actuelle : il est peu aisé d'atteindre par injection les cellules de muscles profonds comme le diaphragme, le cœur... De plus, le tissu musculaire étant distribué de façon diffuse au sein de l'organisme, il n'est pas envisageable de pouvoir traiter une maladie atteignant les muscles dans leur ensemble par une simple injection intra-musculaire, et des injections répétées ne peuvent concerner que des muscles superficiels. Ces obstacles sont rencontrés à la fois chez l'Homme et chez le Chien, dont la distribution musculaire est similaire. Nous verrons ultérieurement que la recherche se penche actuellement sur des techniques de thérapie génique basées sur des injections par voie-intraveineuse afin d'obtenir une répartition idéalement homogène du vecteur dans les cellules cibles.

b – Organes des sens [118]

La vue du Chien est faible. Il voit moins loin que l'Homme et son acuité est très inférieure. De plus, il ne semble pas posséder de vision chromatique. Il aurait, par contre, une bonne perception des formes. Les chiens manifestent des réactions de peur très vives devant des formes nouvelles et inconnues et les chiens de berger peuvent percevoir un signe de la main à 1800 mètres. Du point de vue anatomique, l'œil du Chien a une structure comparable à celle de l'Homme. Là encore, nous verrons dans une troisième partie en quoi ces analogies structurales et fonctionnelles permettent l'application d'essais, concluants chez le Chien, à l'Homme pour des maladies génétiques oculaires.

L'oreille du Chien est sensible à des sons inaudibles pour l'Homme. Le Chien « entend » les ultrasons jusqu'à 35000 cycles par seconde.

Au sein des papilles fungiformes, l'organe gustatif proprement dit est constitué par les bourgeons du goût. On dénombre, pour chaque bourgeon, trois fibres de transmission chez le Chien.

L'odorat prédomine nettement chez le Chien. C'est l'animal « osmatique » par excellence. La surface de la muqueuse sensorielle est estimée à 85 cm² pour un Fox Terrier, 200 cm² pour un Berger Allemand. La muqueuse olfactive d'un grand chien aurait une surface de 7000 mm² et contiendrait $2,8 \times 10^8$ cellules contre 500 mm² et 2×10^7 chez l'Homme. Le chien sent des substances qui sont inodores pour nous : quinine, solution diluée d'HCl, de SO₄H₂. Des odeurs organiques (urine, sang, poils) sont perçus même en solutions étendues et reconnues spécifiquement. Avant tout, les acides gras et en général les acides, sont bien perçus.

4 – Organisation du système immunitaire du Chien [43, 73]

a - Introduction

L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme pluricellulaire de maintenir la cohérence des cellules qui le constituent, et d'assurer son intégrité en éliminant ses propres constituants altérés et les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels il est exposé. Cette fonction met en jeu deux catégories de processus, apparus successivement au cours de l'évolution des espèces et étroitement intriqués dans les organismes supérieurs comme l'Homme ou le Chien:

-l'immunité non spécifique ou immunité naturelle (ou encore immunité spontanée) : effet de barrières naturelles pour la peau et les muqueuses (et mécanismes annexes : sécrétions, effets de

chasse, péristaltisme, flores commensales, desquamation et renouvellement des épithéliums), réaction inflammatoire et système du complément, cellules phagocytaires et cellules natural killer (NK), interférons.

-l'immunité spécifique ou immunité acquise, adaptée à la défense contre un antigène donné, qui repose sur l'activation sélective des cellules lymphoïdes (lymphocytes T et B) en conjonction avec les cellules présentatrices d'antigène. La réaction immunitaire conduit à la mise en jeu d'une réponse humorale avec sécrétion d'anticorps spécifiques et/ou d'une réponse cellulaire assurée par les lymphocytes T agissant par contact direct (cytotoxicité) ou en libérant des médiateurs susceptibles de mobiliser différentes cellules effectrices (macrophages, cellules cytotoxiques).

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des moyens de défense de l'organisme contre les agressions extérieures. Ce système est constitué avant tout de très nombreuses cellules disséminées dans l'organisme, parfois regroupées en unités spécialisées, en particulier au sein des tissus en contact avec le milieu extérieur (peau, muqueuses digestives ou respiratoires). Il s'agit donc d'un système extrêmement diffus et complexe. Le système immunitaire du Chien est organisé à l'image de ce qui est connu chez l'Homme. Nous nous attacherons à en présenter les grandes lignes tout en soulignant les particularités propres à l'espèce canine. Ces connaissances sont importantes à prendre en compte en thérapie génique, puisque la maîtrise de la réaction de l'organisme face à l'introduction d'un vecteur est la clé du succès thérapeutique.

b – Les cellules de l'immunité

Toutes ces cellules dérivent d'une cellule souche pluripotente présente dans la moelle osseuse. Elles vont par la suite se différencier en deux lignées cellulaires : la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde.

- La lignée lymphoïde

A partir de cet ancêtre se différencient deux types de lymphocytes : les lymphocytes B (LB), présents dans la moelle osseuse, et les lymphocytes T (LT), qui ont migré vers le thymus. Ceux-ci se sub-divisent en trois catégories. Des molécules de surface distinguent les différentes classes de lymphocytes.

- Les LT :

-T cytotoxique : ils présentent sur leur membrane des récepteurs pour les produits de classe I du CMH et des récepteurs pour l'antigène (plusieurs récepteurs identiques).

-T Helper (ou T auxiliaire) : portent sur leur membrane les récepteurs pour les produits de classe 2 du CMH et des récepteurs pour l'antigène.

-T suppresseurs : ils ont un rôle important, mais que l'on connaît assez mal. Ils permettraient de tempérer la réponse immunitaire

- Les LB :

Ce sont des précurseurs, car ils se différencient par la suite en plasmocytes qui produisent les anticorps. Ils présentent à la surface de leur membrane les produits de classe 2, ainsi que des immunoglobulines (ou anticorps).

- Autres lymphocytes :

Se rapprochent de cette lignée les cellules Natural Killer (NK), mais ils n'interviennent pas dans l'immunité spécifique, même s'ils ont un ancêtre commun avec les autres lymphocytes. Ils libèrent des cytokines (dont les interférons) et détruisent les cellules cibles (cellules tumorales ou infectées par des virus). Ils sont responsables de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.

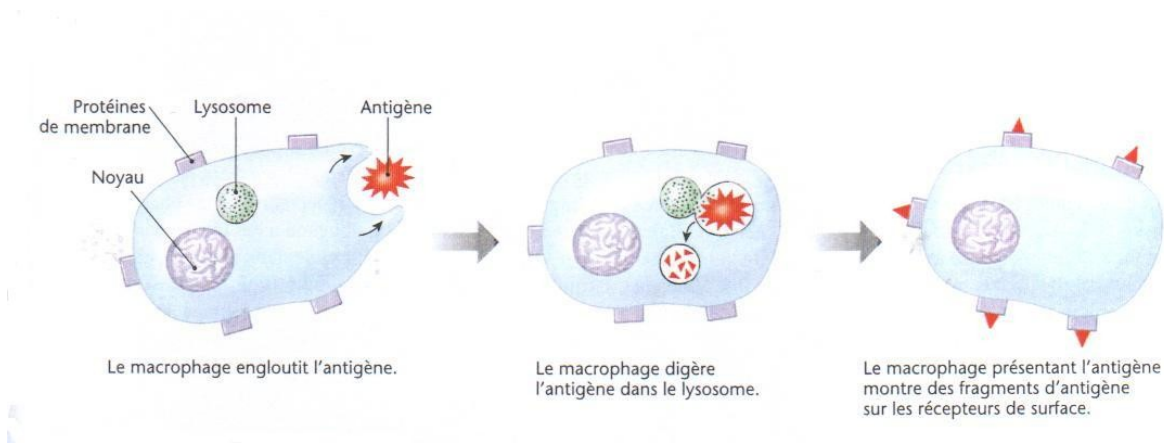
Chez le Chien et chez l'Homme, les LT et LB sont au nombre de 10^{12} cellules chez l'adulte, ce qui correspond à 2% du poids du corps.

- La lignée myéloïde

La lignée myéloïde donne naissance, pour ce qui est des cellules de l'immunité, aux :

- Monocytes : il s'agit d'un groupe. Ce sont les précurseurs des macrophages et des CPAG (cellules présentatrices d'antigène) (figure 41). Ils présentent les produits de classe 2 et possèdent des récepteurs pour les fractions C3a, C3b et C5a du complément.

Figure 41: Cellules présentant l'antigène [37].



- Granulocytes : on distingue les éosinophiles, cellules cytotoxiques capables de tuer des parasites par dégranulation de substances cytotoxiques ; les basophiles capables de dégranuler des substances médiateurs de l'inflammation (histamine...) et des cytokines ; et les neutrophiles, cellules phagocytaires également capables de libérer différentes cytokines dont les agents pyrogènes et des médiateurs de l'inflammation.

c – Autres agents :

- Le complément

C'est un ensemble de plus de 25 protéines dont beaucoup sont des protéases (c'est-à-dire qu'elles lysent les protéines). Leur rôle est extrêmement important, car elles ont trois activités principales :

- activation de cellules pour la phagocytose grâce à des facteurs
- opsonisation : le complément grâce à sa molécule C3b va servir à opsoniser, c'est-à-dire recouvrir la membrane des micro-organismes de protéines et faciliter leur dégradation par les phagocytes.
- cytolysse : dégradation de cellules en créant un complexe lytique C5-C9 qui va créer un canal au niveau de la membrane des micro-organismes et ainsi engendrer une perturbation de l'homéostasie et conduire à leur lyse.

L'activation du complément peut se faire par deux voies :

-la voie « classique » : environ 20 protéines interviennent. Cela nécessite un préalable : le microorganisme doit être reconnu par des anticorps qui vont cibler le déterminant antigénique, et ces anticorps doivent appartenir à deux classes précises : IgG ou IgM seulement.

-la voie alterne (inée, primitive) : elle est plus simple car ne nécessite pas la présence d'anticorps. Seules suffisent la présence de membrane activatrice (membrane avec présence de polysaccharides) et celle de C3b. Si la voie classique est lancée, il y a production de C3b donc activation de la voie alterne..

C3b peut aussi servir à l'opsonisation des microorganismes. C3a et C3b ont plusieurs rôles :

-ce sont des facteurs d'activation cellulaire : tous les phagocytes présentent au niveau de leur membrane des récepteurs aux fractions C3a et C5a du complément

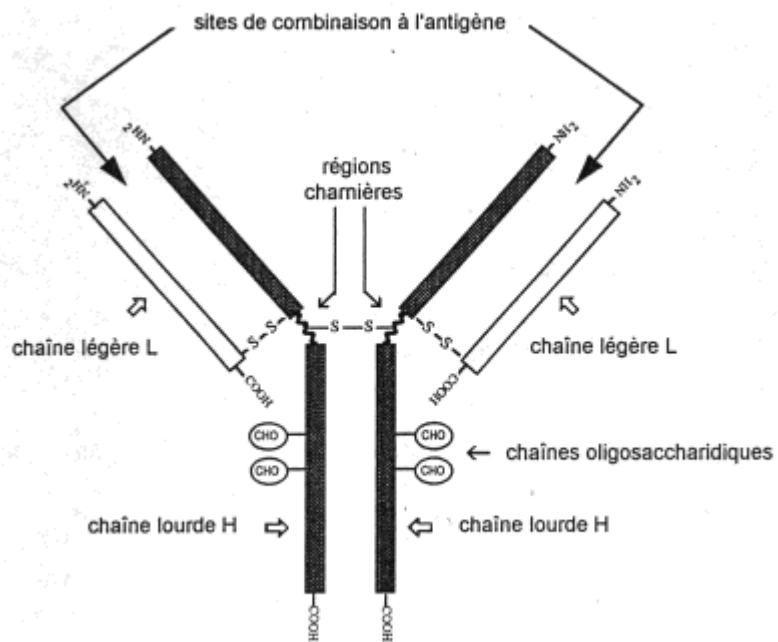
-anaphylatoxines sur les basophiles et les mastocytes tissulaires. C3a et C5b se fixent et conduisent à la dégranulation et à la libération d'histamine, entre autres.

-chimiotactiques et pro-inflammatoires : contraction des muscles lisses et augmentation de la perméabilité cellulaire. Ils attirent les phagocytes jusqu'aux sites inflammatoires.

- Les anticorps (figure 42)

Ce sont des oligoprotéines présentes dans le sérum et le liquide interstitiel. Elles sont synthétisées par les lymphocytes B quand l'individu rentre en contact avec des immunogènes. Il y a 5 classes d'anticorps : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Une molécule d'anticorps possède deux sites de liaison avec l'antigène. Pour une même Ig, on distingue à une Ig deux parties : une partie Fc (fragment cristallisable) constante et capable de se lier à la membrane de certaines cellules, et une partie Fab (*fragment antigen-binding*) spécifique d'un épitope capable de fixer un antigène.

Figure 42: Organisation générale d'une immunoglobuline [72].



L'ensemble des cellules du système immunitaire est rappelé dans la figure 43 .

Figure 43: Cellules du système immunitaire [37].

	Polynucléaires basophiles et mastocytes	Polynucléaires neutrophiles	Polynucléaires éosinophiles	Monocytes et macrophages	Lymphocytes et plasmocytes	Cellules dendritiques
						
% des leucocytes dans le sang	Rares	50-70 %	1-3 %	1-6 %	20-35 %	Inconnu
Sous-types et surnoms		Appelés « polys » ou « segs ». Les immatures sont appelés « bands » ou « stabs ».		Appelés système phagocytaire mononucléaire	Lymphocytes B Plasmocytes Lymphocytes T Cellules cytotoxiques T Lymphocytes T auxiliaires Cellules tueuses naturelles (ou cellules NK pour natural killer) Cellules à mémoire	Appelées aussi cellules de Langerhans, cellules voilées
Fonction essentielle	Libèrent les substances chimiques médiatrices des réponses anti-inflammatoires et allergiques	Ingèrent et détruisent les envahisseurs	Détruisent les envahisseurs, particulièrement les parasites couverts d'anticorps	Ingèrent et détruisent les envahisseurs Présentation antigénique	Réponses spécifiques aux envahisseurs, y compris production d'anticorps	Reconnaissent les agents pathogènes et activent les autres cellules immunitaires par présentation d'antigènes
Classifications		Phagocytes				
		Granulocytes				
			Cellules cytotoxiques		Cellules cytotoxiques (quelques types)	
					Cellules présentant l'antigène (CPA)	

d – Immunité à médiation humorale

- La réponse anticorps

Lors d'un premier contact avec un antigène donné, ce sont les IgM qui apparaissent en premier. Ils sont capables d'activer le complément. On a donc une croissance exponentielle de la production d'IgM, puis un plateau. Au bout de 14 jours la quantité d'IgM circulantes est revenue à son niveau initial.

Lors d'un second contact avec ce même antigène ce sont cette fois les IgG qui apparaissent les premiers, avec une augmentation forte et rapide, puis un taux qui se maintient assez longtemps. Lors de la réponse secondaire, il y a donc une augmentation accrue de la production d'IgG car il y a lors de la réponse secondaire une commutation de classe : production d'IgG plutôt que d'IgM, IgG à très forte affinité vis-à-vis de l'antigène. Ceci reflète l'existence d'une mémoire immunitaire.

- Les mécanismes de la production d'anticorps

- Pour les antigènes « T-dépendants »

L'antigène va être phagocyté par un macrophage, qui après l'avoir internalisé et dégradé en partie va l'analyser et en extraire les peptides hautement antigéniques. Il va ensuite les exprimer à la surface de sa membrane, associés aux produits de classe 2. Il les présente ainsi aux LTauxiliaires qui, de leur côté, possèdent un récepteur spécifique de l'antigène et des produits de classe 2.

Cette reconnaissance, combinée à la production d'IL-1 (interleukine 1) par le macrophage, va constituer un signal intracellulaire d'activation ayant plusieurs effets : le LTauxiliaire va se mettre à produire de l'IL-2, qui va créer une boucle autocrine de rétro-contrôle positif sur sa propre production, ce qui va faciliter la reconnaissance de l'antigène, puis le LTauxiliaire va se diviser en une cellule mémoire et une cellule effectrice, qui elles-mêmes vont se diviser...C'est l'expression clonale.

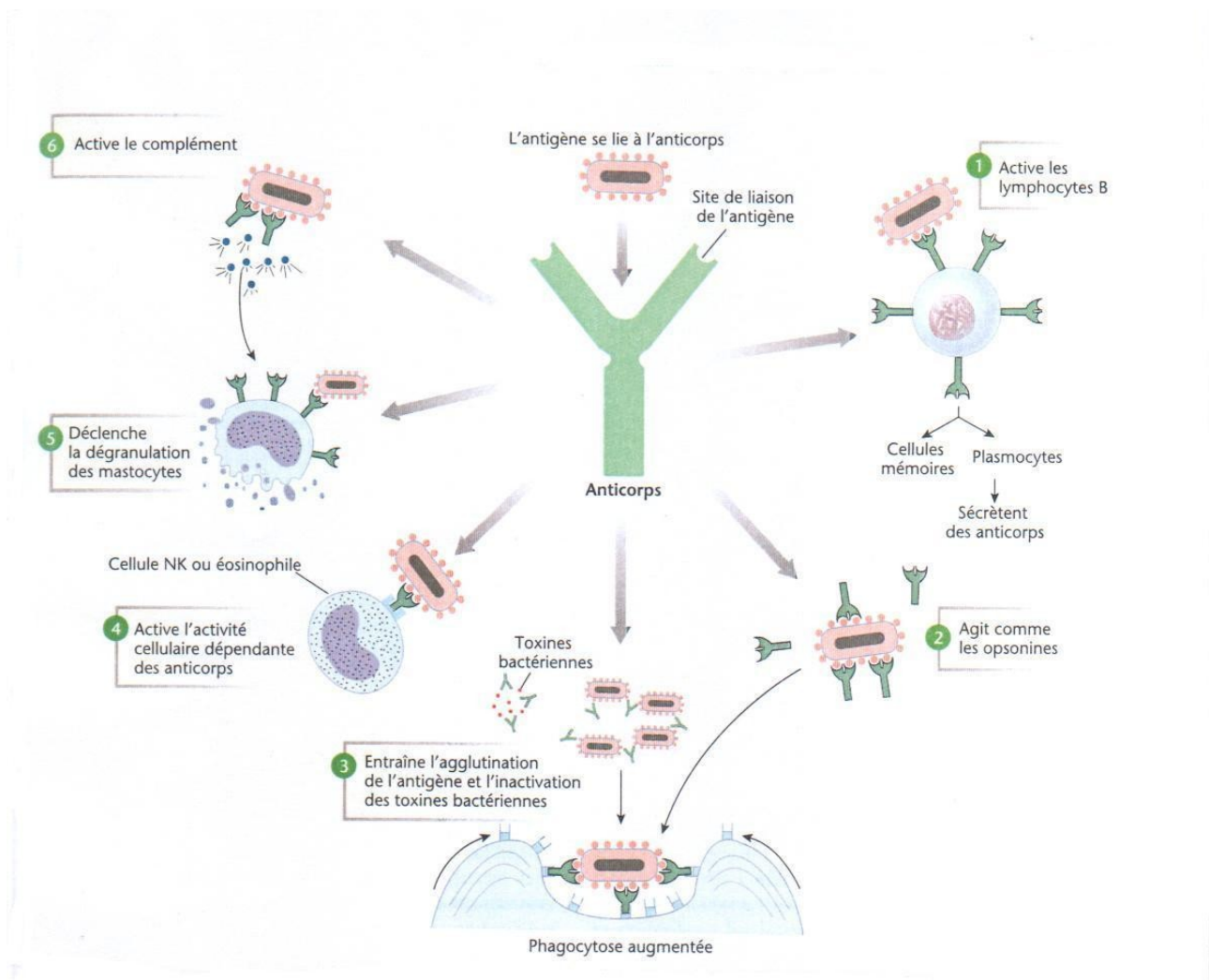
La LTauxiliaire effectrice va par la suite aller à la rencontre d'un LB qui a reconnu l'antigène grâce à une Ig. Le LTauxiliaire va reconnaître lui aussi l'antigène présenté à la surface du LB, et l'aider à se différencier lui aussi. Il va pour cela produire les facteurs *helper* qui vont activement participer à la prolifération clonale du LB, avec apparition de cellules filles « mémoire », et de cellules filles effectrices qui vont se différencier une ultime fois en plasmocytes et produire des Ig.

- Pour les antigènes « T-indépendants »

Il s'agit là d'antigènes reconnus par les LB sans passer par des CPAG. Le système est donc plus rapide : le LB, avec ses Ig membranaires, va reconnaître les déterminants antigéniques, ce qui va conduire à l'activation du LB et induire sa prolifération et sa différenciation en plasmocyte.

Les différentes fonctions des anticorps sont schématisées dans la figure 44.

Figure 44: Fonctions des anticorps [37].



e – Immunité à médiation cellulaire

Les anticorps ne sont utiles que lorsque les antigènes sont circulants et peuvent donc être neutralisés par des complexes immuns. Pour ce qui est des antigènes pénétrant dans les cellules, cette immunité n'est pas suffisante et efficace. Elle passe alors le relais à l'immunité spécifique d'ordre cellulaire.

- Activation des Ltcytotoxiques (LTc)

Prenons l'exemple de l'infection par un virus. Les macrophages et CPAG présentent à leur surface les déterminants antigéniques associés aux produits de classe 1. Il les présentent à un LTc appartenant au pool naïf, vierge, équipé de récepteurs pouvant reconnaître les produits de classe 1 et un antigène. Il va y avoir fixation du LTc sur le macrophage, qui va alors produire de l'IL-1, induisant à son tour une production d'IL-2 par le LTc, ce qui va créer une boucle autocrine positive,

et la multiplication et différenciation du LTc avec comme précédemment un pool « mémoire » et un pool effecteur.

Ce pool effecteur est composé de LTc présentant de grosses vésicules de sécrétion dans leur cytoplasme, leur permettant d'exercer une activité cytotoxique. Ces cellules vont alors scruter l'ensemble de l'organisme à la recherche de l'antigène associé aux produits de classe 1, c'est-à-dire les cellules infectées par ce virus. La lyse cellulaire s'effectue par dégranulation du LTc. Il y a alors exocytose des granules avec libération de ses substances cytotoxiques qui vont s'attaquer à la cellule infectée. Il y a donc mort de la cellule par apoptose. Le virus arrête de proliférer et l'infection est stoppée.

- Rôle central des macrophages

Les macrophages jouent un rôle fondamental dans la médiation cellulaire de l'immunité. Ils assurent une fonction de :

- phagocytose
- présentation des produits de classe 2
- présentation de l'Ag, de par leur capacité de phagocytose
- orientation de la réponse immunitaire vers la production d'Ig
- initiation de la réponse inflammatoire
- combattre les agents pathogènes
- participation à la réparation des tissus

f – La réaction immunitaire lors d'une infection virale

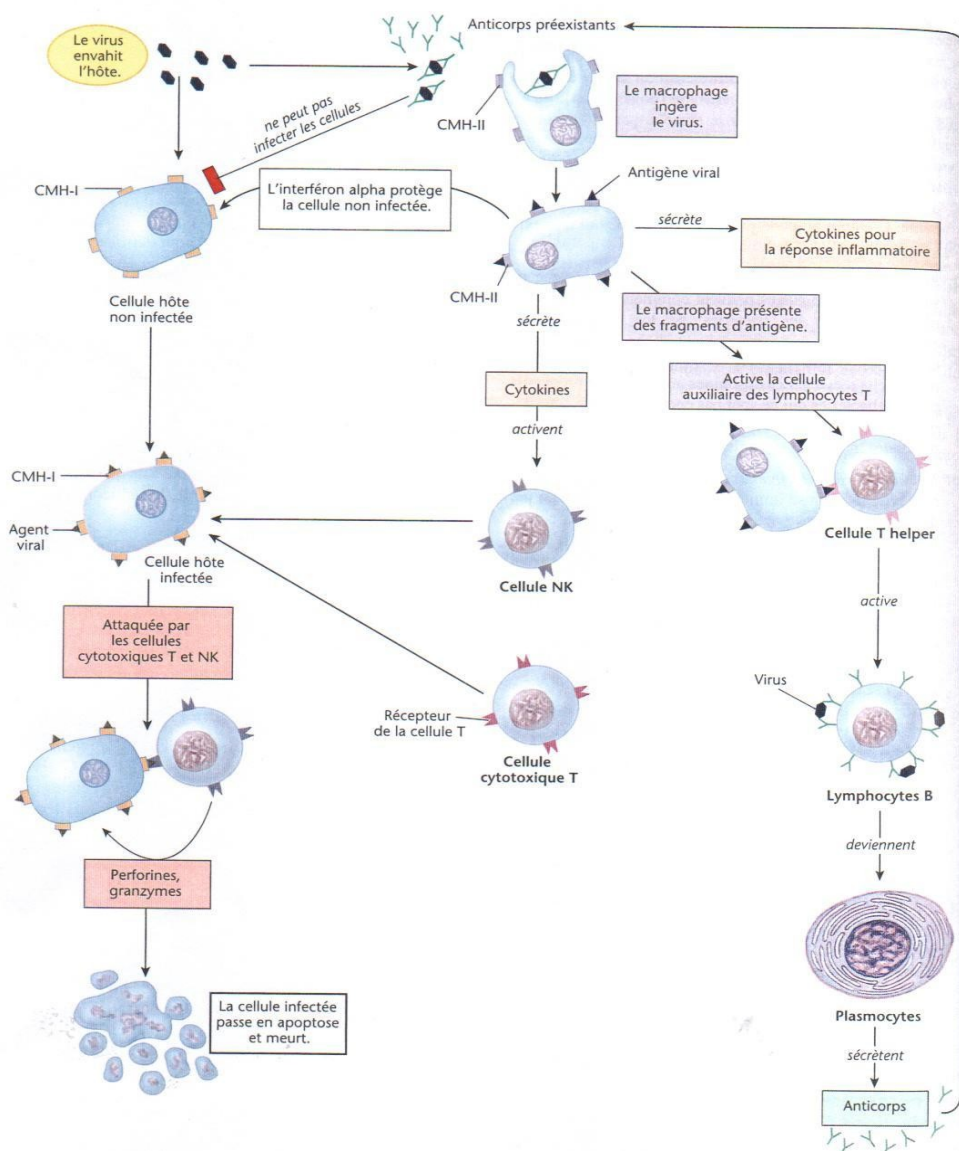
Parce que la plupart des vecteurs aujourd'hui utilisés en thérapie génique sont à la base des particules virales, il est important d'envisager comment l'organisme réagit face à leur introduction *in vivo*.

Quelque soit le mode de contamination, à partir du moment où il est entré dans l'organisme, le virus est véhiculé par le flux sanguin et lymphatique jusqu'à des organes du système immunitaire,

tels les ganglions lymphatiques et la rate. Seuls les macrophages et plus encore les LTauxiliaires sont, dans les organes, les cellules cibles du virus.

Les cellules touchées par les virus sont celles qui présentent la protéine membranaire CD4. Cette molécule (ou marqueur) se trouve en forte quantité à la surface des LT4 (ou LTh) et à moindre degré sur les macrophages et les monocytes. Le virus se lie avec une grande affinité à la protéine CD4 sur la surface de la cellule cible. La capside ou le matériel génétique seul du virus pénètre alors dans la cellule. Suite à une seconde attaque virale, une coopération entre LT et LB se met en place et l'immunité à médiation cellulaire et à médiation humorale interviennent (figure 45).

Figure 45: Réponses immunitaires aux virus. La figure suppose une exposition antérieure au virus et la présence d'anticorps préexistants [37].



Ces mécanismes sont importants à connaître étant donné que le système immunitaire est souvent la source d'une expression insuffisante du gène transféré par thérapie génique. En effet, les défenses de l'organisme reconnaissent la particule virale qu'est le vecteur comme un antigène. La réaction immunitaire qui se met alors en place empêche l'expression du transgène sur une durée suffisante et en quantité efficace. De nombreuses recherches tentent de maîtriser cette réaction immunitaire afin d'amener l'organisme à une immunotolérance du vecteur administré. Cette « immunosuppression maîtrisée » est indispensable.

C – Particularités et pertinence du modèle canin en thérapie génique

1 – Nécessité d'un modèle intermédiaire

Jusqu'à il y a une dizaine d'années, généticiens et biologistes s'appuyaient sur des modèles animaux pour comprendre le fonctionnement des gènes, ou pour reproduire des "modèles" de maladies génétiques humaines. Ces modèles appartiennent à des espèces telles que le Rat, la Souris, la Drosophile ou le nématode *C.elegans*, incontournables en génétique. Ils ont chacun leur spécificité et leurs avantages. Mais si les systèmes des rongeurs sont génétiquement faciles à analyser, les mutations sont plus fréquemment dues à des allèles émergeant de manière induite (programmes de mutagenèse chez la Souris) plus que naturelle. Ce ne sont donc pas les "vrais" homologues des maladies humaines. Par exemple, la souris *mdx* (mutation du gène de la dystrophine) dont la physiopathologie est tout à fait différente de la maladie retrouvée chez l'Homme (la myopathie de Duchenne), ne développe pas de myopathie. Ainsi, pour comprendre des mécanismes physiopathologiques conduisant à l'apparition de maladies génétiques, le Rat ou la Souris ne sont pas toujours appropriés car leur physiologie reste différente de celle de l'Homme; certaines maladies portent à l'inverse une dénomination identique chez l'Homme et chez le Chien (l'hémophilie B par exemple) [44]. Enfin, grâce aux études comparatives de cartographie et de séquençage (voir plus loin), il est maintenant évident que leurs génomes présentent de nombreuses synténies (conservation de blocs de gènes où l'ordre des gènes est identique entre deux génomes) [67].

Le deuxième point faisant du Chien un modèle unique pour la génétique réside dans les possibilités permises par son gabarit. En effet, les perspectives d'exploration biologique et de traitement se rapprochent de celles souhaitées en médecine humaine; citons brièvement comme exemple l'utilisation de la voie oculaire dans la recherche et les essais de thérapie génique sur la

dystrophie rétinienne progressive chez le chien Briard, bien plus accessible que l'emploi de la même voie chez une souris.

Enfin, il faut souligner les intérêts d'un animal de compagnie comme modèle: d'une part, le Chien bénéficie des avancées de la médecine humaine. Par conséquent, l'état de santé du Chien est bien suivi et ceci permet la comparaison détaillée entre les maladies canines et humaines [113]. D'autre part, l'environnement des chiens (pour les animaux issus de lignées naturelles) est similaire à celui de l'Homme, ainsi que son exposition à certains agents chimiques, son lieu de vie, les stress subis, parfois même l'alimentation... [45], ce qui rend possible l'étude de l'impact du milieu extérieur sur les modalités d'apparition des maladies génétiques entre autre.

Dans le cas de l'utilisation du Chien dans le cadre expérimental, où les lignées sont développées par croisement d'individus affectés de la même race ou de deux races affectées, les conditions environnementales sont constantes sur de longues périodes, augmentant considérablement les capacités de détection d'effets génétiques [99]. Elles permettent également de générer des lignées complexes qui sont plus puissantes pour les analyses génétiques que les lignées canines classiquement disponibles. Un autre avantage d'une telle lignée est que des conditions environnementales différentes peuvent être imposées séquentiellement à des individus pour caractériser l'interaction génotype – environnement. Pourtant les colonies expérimentales présentent aussi quelques inconvénients: elles nécessitent de l'argent et de la disponibilité. De plus, la création d'une colonie unique peut empêcher la détection de tous les gènes responsables de la maladie étudiée. En effet, les colonies expérimentales peuvent être comparées aux populations humaines isolées, dont le brassage des allèles est faible.

Ainsi, le chien représente un candidat idéal pour l'étude de sa génétique compte – tenu de sa proximité avec l'Homme, mais aussi de son gabarit. Nous allons voir que sa prédisposition à certaines maladies génétiques retrouvées en médecine humaine explique l'émergence de son utilisation dans le domaine de la recherche en génétique.

2 – Entretien du Chien en animalerie [118]

Comme les autres modèles animaux, le Chien possède des particularités liées à sa physiologie. Nous présenteront les besoins d'un tel animal expérimental, ainsi que les modalités pratiques auxquelles les équipes de recherche doivent faire face. Toutes les mesures prises ayant pour but, au final, d'obtenir des lots homogènes d'animaux de même race en général, de même type.

a - L'alimentation

Les besoins sont calculés selon le stade physiologique des chiens (jeune, femelle gestante...), mais aussi en fonction de leur activité journalière. C'est durant la phase de croissance (jusqu'à un an) que les besoins alimentaires sont les plus impérieux.

En général, l'eau de boisson est distribuée par des abreuvoirs automatiques. Le problème se pose de la séparation des animaux se trouvant dans un box commun lors de l'alimentation, puisque la distribution est souvent source de conflits intra-lots. Un seul repas quotidien suffit généralement à l'adulte, car la digestion gastrique est lente chez cette espèce. Il faut éviter de brusques changements de régime alimentaire, ne jamais suralimenter, mais au contraire régler la quantité de nourriture d'après les besoins, les dépenses de l'animal. Là aussi, l'expérience et l'observation priment sur les données théoriques.

b - Choix de la race

Le comportement, de nombreux caractères anatomiques et physiologiques, la résistance aux maladies, à l'infection, mais aussi la prédisposition à certaines affections génétiques...varient en effet suivant les races de chiens. Aucune autre espèce n'offre une plus grande diversité.

De multiples facteurs et coordonnées ont déterminé le choix de races de chiens d'expérimentation convenant le mieux possible. De façon générale, on retient les critères suivant :

- Régularité génétique : il convient d'utiliser une race assez répandue d'origine ancienne, dont les caractères sont bien fixés à la suite de nombreuses générations en race pure.
- Taille et poids moyen : le poids adulte idéal allant de 10 à 15 kg. L'animal est alors facile à manier, économique, ne prend pas trop de place et exige moins de produit pour de longues expériences (tels que les vecteurs par exemple).

- Maturité sexuelle précoce, avec deux portés par an et une mise bas facile, donnant le plus de chiots possibles.
- Pelage ras facilitant les mesures d'hygiène nécessaires mais aussi les opérations chirurgicales.
- Tempérament paisible, caractère facile ; c'est-à-dire des animaux calmes, n'aboyant pas trop, se laissant traiter et n'ayant pas un gros besoin d'activité physique.
- Animal sociable et habitué à vivre en groupe, en meute.

De plus, le chien d'expérimentation doit être en parfaite santé et exempt de toute infection latente. Les conditions de vie et d'environnement (alimentation, logement...) doivent demeurer les plus constantes possibles durant l'expérimentation. De nombreuses races ont été proposées, parmi lesquelles le Labrador Retriever, le Colley, ou encore le Beagle, ce dernier étant le plus employé car il remplit la plupart des exigences citées précédemment.

Cependant, il convient de noter que dans le cas des maladies génétiques, la mutation causale est souvent race spécifique et il n'est plus possible de choisir la race puisqu'elle s'impose naturellement. Par exemple, la cécité nocturne du Briard n'est présente que chez le Briard [83].

c - Logement

Dans un centre d'expérimentation animale, le logement des chiens doit comporter deux groupes de bâtiments séparés par une certaine distance. Le premier groupe constituant le ou les chenils d'élevage, le second le ou les chenils d'expérimentation. Il est préférable que ces chenils, et principalement ceux de l'élevage, soient, autant que possible, éloignés des grandes voies de communications et des laboratoires. Le fait de diviser le chenil en plusieurs unités permet une plus grande souplesse dans l'utilisation, une lutte plus efficace contre les maladies infectieuses, sans parler de la réduction du bruit.

Dans un chenil d'élevage, il est d'usage de prévoir un secteur maternité, un secteur réservé aux mâles reproducteurs où se font les saillies et une dernière partie pour les adultes. Les boxes communiquent avec les aires d'exercice par une porte coulissante et sont grillagés afin que le plancher laisse passer les excréments et l'urine. En général, une niche attenante complète cette cage d'une superficie moyenne de 2 m².

Pour le chenil d'expérimentation, l'agencement est assez souvent similaire, avec de petites unités, de l'ordre d'une cinquantaine de boxes. Chacun est bien évidemment équipé d'un système de ventilation, de chauffage, et de distribution d'eau potable à minima.

d - Hygiène

Pour les locaux, la plupart des centres de recherche utilisent de la sciure de bois pour absorber l'urine et les excréments des animaux. Une désinfection est effectuée à l'aide de produits désinfectants (le crésyl par exemple) et antiparasitaires périodiquement, et après chaque déplacement des chiens.

Les animaux introduits provenant d'élevages extérieurs sont mis en quarantaine avant leur utilisation. Une prophylaxie antiparasitaire et anti-infectieuse (planning de vermifugation et de vaccination adaptés) est également mise en place [118].

Le Chien est donc un animal relativement exigeant du point de vue de son entretien en animalerie, si on compare ses besoins à ceux de modèles comme la Souris. Néanmoins, les progrès qu'il permet, dans le domaine de la thérapie génique mais également bien d'autres, justifient les moyens mis en œuvre pour son élevage dans les centres de recherches. Moyens qui ne s'arrêtent pas aux modalités d'élevage, mais qui sont également importants dans les techniques expérimentales employées et les éléments de suivi et d'évaluation des traitements.

3 – Médecine et chirurgie du Chien

La médecine humaine a connu ces dernières décennies un développement impressionnant, notamment au niveau des nouvelles technologies utilisées et de nombreuses chirurgies dorénavant devenues courantes. Les examens d'imagerie comme l'IRM (imagerie par résonance magnétique) ou le scanner sont utilisés en routine dans de nombreux centres hospitaliers, et des interventions comme la greffe rénale, que l'on considérait il y a quelques temps comme expérimentale, est pratiquée régulièrement en Europe. Des domaines très variés de la médecine et de la chirurgie humaine sont touchés par ces avancées récentes, il est illusoire de vouloir en dresser une liste exhaustive.

Il est cependant intéressant de noter que chez le Chien, là aussi, la médecine et la chirurgie vont de plus en plus loin. Il s'agit du résultat de la recherche bien sûr, mais aussi de l'adaptation des connaissances humaines à la physiopathologie canine. On comprend alors mieux l'intérêt des

nombreuses analogies physiologiques chez ces deux espèces énumérées plus haut. Le Chien étant un mammifère de gabarit similaire à celui de l'être humain, il a été possible de calquer divers protocoles diagnostiques et thérapeutiques d'une espèce à l'autre. Pour reprendre l'exemple précédent, scanner et IRM sont maintenant accessibles au Chien, même si leur accessibilité est plus limitée à la fois géographiquement et financièrement.

Le développement de la Médecine canine est également permis par la motivation croissante des propriétaires. En effet, le recours à des examens complémentaires et des thérapeutiques plus poussées que ceux couramment employés jusqu'à très récemment n'est possible que si les clients particuliers le permettent. L'apparition de systèmes d'assurances canines assurant tout ou partie des frais vétérinaires soulage la lourdeur financière; il s'agit ensuite de choix individuels au cas par cas.

Le Chien tire profit des connaissances dans de multiples domaines de la médecine humaine. Les vétérinaires se spécialisent de plus en plus, et les cliniques qui voient le jour actuellement comptent souvent plusieurs associés, ce qui permet de répartir les domaines d'exercice. Les examens complémentaires dont ces structures sont dotées comportent généralement un appareil radiographique numérique, des locaux adaptés à la gestion des urgences, etc.

On comprend ainsi que le Chien, en tant qu'animal domestique, profite des avancées médicales actuelles, et les exemples seraient nombreux. A l'inverse, ce haut degré d'investigation et de médication dans l'espèce canine est là encore un avantage pour l'Homme : les résultats des essais cliniques testés chez le Chien peuvent être réalisés et évalués au moyen de diverses techniques. Dans le domaine de la thérapie génique par exemple, l'expression du gène désiré est observée et quantifiée grâce à des procédés de marquage variés (immunofluorescence par exemple).

S'il n'existe pas de modèle idéal, le Chien regroupe néanmoins de nombreux avantages pour son utilisation dans la recherche en thérapie génique. Après avoir compris pourquoi, nous allons voir comment cette espèce est arrivée au rang de modèle si prometteur pour le traitement de nombreuses maladies génétiques retrouvées chez l'Homme.

D – Les essais de thérapie génique chez le Chien

Nous avons vu précédemment que le chien, en tant que mammifère domestique, représente un modèle pour la recherche hors du commun. Le domaine de la thérapie génique s'y est progressivement intéressé, et nous allons voir quelles ont été les principales étapes ayant mené à son statut actuel de modèle pour de nombreuses maladies génétiques retrouvées chez l'Homme. Ainsi, nous présenterons les débuts des essais de thérapie génique chez le Chien, avant d'envisager les grandes avancées expliquant la diversité et le nombre de recherches actuellement en cours.

1 – Historique et premier succès [9, 65]

Les avancées rapides en termes de compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de plusieurs maladies héréditaires chez le Chien ont ouvert la possibilité de tenter de corriger ces dernières par la thérapie génique. Aux Etats-Unis comme en Europe, les organismes autorisant la mise en route des essais cliniques chez l'Homme sont beaucoup moins réfractaires lorsque de préalables succès ont été connus chez un modèle animal pour la même maladie. En effet, prouver que les effets secondaires sont minimes, que le traitement apporte des résultats chez l'animal, permet d'espérer de plus grandes chances de succès chez l'être humain, et une innocuité moindre. L'avantage de la médecine vétérinaire est qu'une fois qu'un essai expérimental est validé, le traitement peut rapidement être utilisé en pratique sur une clientèle privée.

Le premier rapport de succès en thérapie génique chez le Chien date de 1993. Une correction partielle de l'hémophilie B (maladie génétique où le facteur IX, responsable du processus normal de coagulation, est déficient) a été obtenue en utilisant des vecteurs recombinants rétroviraux. Depuis cela, des dizaines d'autres succès ont été recensés pour l'hémophilie A et B avec des modalités d'administration des vecteurs variées. Ces travaux effectués sur l'hémophilie, grâce au modèle canin, ont permis la mise en route d'essais cliniques chez l'Homme [118].

Un des résultats les plus spectaculaires de thérapie génique est la capacité à restaurer la vision dans certains cas de cécité. En 2001, le professeur Acland et son équipe (voir III) ont rendu compte de leur étude menée sur des chiens atteints d'une mutation sur le gène RPE65, et responsable d'une cécité juvénile [2] ; l'équipe du Dr. Narfstrom a également réussi à montrer qu'il est possible de restaurer la vision chez des adultes atteints en injectant un vecteur portant le gène manquant dans l'espace subrétinien [85].

D'autres cas de thérapie génique réussie sont décrits chez le Colley gris atteint de neutropénie cyclique. Un vecteur lentivirus a été utilisé pour distribuer un facteur permettant la stimulation des granulocytes. Les injections intramusculaires ont permis d'obtenir une

augmentation significative du taux de granulocytes neutrophiles qui persistait jusqu'à 17 mois. Enfin, la thérapie génique a également été validée dans le traitement des maladies de stockage lysosomal, et là encore les essais tentés chez l'Homme depuis laissent espérer la commercialisation à court terme d'un traitement pour ces maladies débilitantes [118].

Toutes ces avancées ont permis au Chien de se faire une place parmi les modèles actuels de thérapie génique. Aujourd'hui, son rôle n'est plus à prouver, et le nombre d'essais en cours ainsi que la variété des maladies génétiques étudiées en sont les premiers témoins.

2 – Essais en cours, en France et dans le monde

Depuis ces dix dernières années l'utilisation du Chien est grandissante, de nombreuses affections canines se rapprochant de celles retrouvées chez l'Homme. Les données de OMIA permettent d'objectiver cet intérêt porté par la communauté scientifique pour le modèle canin. C'est dans cette espèce que l'on recense actuellement le plus de maladies monogéniques (près d'un quart du nombre total de maladies monogéniques chez les espèces étudiées ici) et d'affections potentiellement modèles pour celles de l'Homme (22%).

Les 482 maladies ou caractères d'intérêt étudiés recouvrent des domaines pathologiques très variés. Une liste des tests génétiques actuellement disponibles chez le Chien permet de rendre compte de la diversité des affections canines pour lesquelles la ou les mutation(s) et le mode de transmission ont été découverts. Ce sont pour la plupart d'entre elle des maladies monogéniques, pour lesquelles des essais cliniques de thérapie génique sont envisageables et laissent espérer une application chez l'Homme. Le tableau 3 recense les différents domaines de recherche en thérapie génique chez le Chien depuis 2005 ; il prend en compte les essais réalisés et publiés depuis un peu plus de trois années en France et dans le monde sur le modèle canin.

Tableau 3: Recensement des essais cliniques de thérapie génique effectués chez le Chien publiés entre janvier 2005 et avril 2008. D'après le site de recherche bibliographique www.pubmed.com.

Maladie étudiée	2005	2006	2007	2008 (janvier à avril)	Total	% de la totalité
Hémophilie A	5	4	2		11	13,8
Dystrophie épithéliale rétinienne pigmentaire	3	5	3		11	
Ischémie myocardique chronique	2	2	3	2	9	11,3
Dystrophie musculaire de Duchenne		2	3	1	6	7,5
Hémophilie B	2	1	1	1	5	6,3
Déficiences d'adhésion leucocytaire		2	1	2	5	
Tumeurs prostatiques	2		2		4	5
Epidermolyse bulleuse	1	2			3	3,8
Déficiences de vascularisation bronchique			2	1	3	
Syndrôme de Hurler (mucopolysaccharidose)		2	1		3	
Maladie de Van Willebrand		2			2	2,5
Diabète sucré		2			2	
Immunodéficiences combinées sévères		1		1	2	
Lymphome		1		1	2	
Mélanome		1		1	2	
Ostéoarthrite auto-immune	1		1		2	
Maladie de stockage du glycogène (type Ia)				1	1	1,3
Tumeurs pancréatiques			1		1	
Gliome malin			1		1	
Tumeurs mammaires			1		1	
Neutropénie cyclique		1			1	
Ostéosarcome		1			1	
Maladies hémorragiques congénitales	1				1	
Lupus érythémateux	1				1	
Total	18	29	22	11	80	

On note la diversité des maladies à l'étude depuis peu mais aussi que certaines sont l'objet d'une attention toute particulière. Par exemple l'hémophilie A ou la dystrophie rétinienne pigmentaire qui sont des maladies connues également chez l'Homme. En particulier, les maladies oculaires du chien sont nombreuses et souvent homologues de celles rencontrées chez l'Homme, ce qui explique l'engouement des recherches dans ce domaine. Des mutations propres à certaines races ont été mises en évidence, des tests génétiques développés et pour certaines des essais de thérapie génique tentés (voir III). A l'inverse, de nombreuses maladies, moins fréquentes et touchant uniquement le Chien, suscitent un intérêt modéré par la communauté scientifique.

Au travers de cet état des lieux de la recherche en thérapie génique chez l'Homme et chez le Chien, on réalise l'engouement suscité par cette nouvelle approche de la thérapeutique, mais aussi l'intérêt grandissant autour du modèle canin et les avancées faites à ses côtés, laissant espérer beaucoup en termes de santé humaine. Pour certaines maladies, le traitement par les gènes a fait la preuve de son efficacité dans de nombreux modèles animaux et de son innocuité chez l'Homme.

Il s'agit toutefois de nuancer ces résultats: alors qu'elle fonctionne bien chez l'animal, la thérapie génique se montre encore relativement inefficace chez l'Homme et provoque parfois la méfiance voir la crainte de l'opinion public.

III – ILLUSTRATIONS DE L'INTERET DU MODELE CANIN EN THERAPIE GENIQUE

Comme nous l'avons vu, les expérimentations chez le Chien se développent dans le domaine de la thérapie génique, essentiellement depuis que ses multiples intérêts en tant que modèle font l'unanimité dans la communauté scientifique. Les exemples de maladies génétiques à l'étude sont nombreux parmi les plus de 450 recensées par la base de données OMIA; certaines d'entre elles, par leurs perspectives d'applications en médecine humaine essentiellement, ont été particulièrement analysées. Les recherches, de plus en plus poussées, ont permis de comprendre les mécanismes génétiques à la base des symptômes observés chez les sujets atteints et ont mené rapidement à des tentatives de traitement par thérapie génique.

Il a été choisi de traiter dans cette ultime partie de deux maladies génétiques touchant le Chien : la dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien du Briard, ou amaurose nocturne stationnaire congénitale et la myopathie de Duchenne chez le Golden Retriever. Parce qu'elles atteignent préférentiellement certaines races, qu'elles ont été définies sur le plan génétique et moléculaire, que des essais ont déjà été effectués et que l'on retrouve des manifestations analogues chez l'Homme, ces maladies illustrent bien l'intérêt du Chien comme modèle pour la thérapie génique. Nous verrons les étapes ayant mené à certains succès thérapeutiques et les difficultés rencontrées, après s'être intéressés à la maladie en elle-même.

A – La dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien chez le Briard

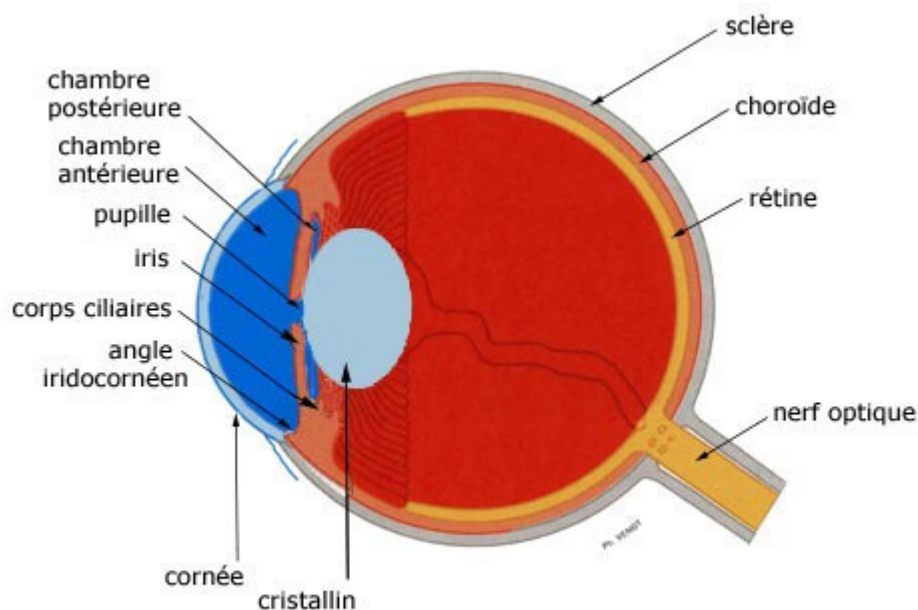
Parmi les multiples maladies oculaires sur lesquelles travaille la communauté des chercheurs en génétique canine se trouve l'amaurose congénitale nocturne et stationnaire du Briard, ou dystrophie progressive de l'épithélium pigmentaire rétinien. Les maladies homologues retrouvées chez l'Homme, de symptomatologie similaire, sont nommées maladie ou amaurose de Leber et dystrophie rétinienne juvénile (forme sévère) [112].

1 – Historique de la maladie

La dégénérescence héréditaire rétinienne est décrite pour la première fois chez le Chien par Lightfoot [74] en 1911; depuis, elle a été recensée dans plus de 80 races canines. Magnusson divise

les races affectées par cette dégénérescence rétinienne en deux groupes : d'une part les races chez qui on retrouve un phénomène global de dégénérescence, d'autre part celles qui développent une atrophie plus localisée. C'est pour ce second groupe que l'on a employé le terme de dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPED, pour *Retinal Pigment Epithelial Dystrophy*), en rapport avec les modifications notées au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) (figure 46). Le RPE est la couche la plus profonde de la rétine, qui se trouve en contact étroit avec les photorécepteurs (cônes et bâtonnets). Il accomplit des tâches essentielles dans le fonctionnement des photorécepteurs. Il recycle et transforme notamment les molécules impliquées dans la conversion du signal lumineux en signal électrique, seul signal interprétable au niveau céphalique. La RPED a été décrite chez le Labrador Retriever et chez le Briard (Berger de Brie) au Royaume-Uni dès 1954, ainsi que certains cas sporadiques dans des races diverses.

Figure 46: Coupe schématique transversale de l'œil d'un chien. D'après Marie Hélène Lasseron, site internet de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (cours en ligne) www.vet-alfort.fr.



La maladie a été mise en évidence par examen ophtalmologique chez 30 à 40% de la population totale de Briard au Royaume-Uni en 1984. De plus, les études faites sur les pedigrees

auxquels appartenait les chiens malades ont suggéré dès lors un mode de transmission autosomique récessif [74].

2 – La maladie génétique chez l'Homme et chez le Briard

La maladie de Leber et la forme juvénile sévère de dystrophie rétinienne chez l'Homme, ainsi que la RPED chez le Chien, présentent de nombreuses analogies, du point de vue des mécanismes moléculaire et génétique sous-jacents.

a - Déterminisme génétique

Se transmettant sur un mode autosomique récessif, ces deux maladies héréditaires ont été expliquées par la présence d'une mutation dans l'ADN des individus touchés qui seraient homozygotes mutés.

Chez le Briard, c'est le gène nommé RPE65 situé sur le chromosome 6 (CFA6) qui a été incriminé; ce dernier code pour une protéine enzymatique microsomale de 65 kilo Dalton (kDa), exclusivement exprimée dans le RPE qui intervient dans le métabolisme rétinoïde [2] en participant à la formation du chromophore rétinale 11-cis (molécule ayant la faculté de changer de couleur, en réponse à une excitation lumineuse ; il s'agit donc d'une molécule indispensable à la vision) dans les photorécepteurs des cellules visuelles pigmentaires [86]. Ainsi, c'est la coopération entre RPE et photorécepteurs qui est rendue impossible et qui crée les symptômes oculaires observés. Des souris déficientes en RPE65 montrent une lacune en rhodopsine (pigment protéique photosensible présent dans les cellules photo réceptrices de la rétine (cônes, bâtonnets) et responsable de la sensibilité de l'œil à la lumière), un dysfonctionnement des bâtonnets, ainsi que des inclusions dans le RPE et une lente dégénérescence rétinienne. Les troubles visuels (voir plus loin) constatés chez les Briard homozygotes RPE65 -/- sont causés par la présence d'une délétion de quatre paires de base sur le gène RPE65 (AAGA). Celle-ci crée un codon stop prématuré ayant pour conséquence la production d'une protéine tronquée inefficace [3].

Chez l'Homme, les mutations du gène RPE65 provoquent des formes de cécité prématurée chez l'enfant telles que l'amaurose congénitale de Leber et la dystrophie rétinienne juvénile sévère (figure 47). Huit mutations sur des loci différents ont jusqu'à présent été recensées [124] dans l'amaurose de Leber, dont RPE65 (dans 3 à 16% des cas) et il existe pour certains des tests génétiques disponibles depuis peu.

Figure 47 : Fond d'œil d'un sujet humain atteint d'amaurose congénitale de Leber. D'après Christian Hamel, INSERM Montpellier France (www.sante-dz.com).



b - Signes cliniques et lésions associées

Dans tous les cas, il s'agit de troubles visuels plus ou moins progressifs, associés ou non à d'autres signes.

- Les Briards portant la mutation du gène RPE65 sont aveugles dans l'obscurité et montrent de graves déficits visuels en plein jour [86]. La mise en évidence du déficit visuel passe généralement par des tests comportementaux, au moyen de parcours ponctués d'obstacles que les animaux doivent éviter. La plupart des chiens présentent un nystagmus et le diamètre de leurs pupilles est légèrement plus important que chez les chiens non atteints. La RPED chez le Briard peut commencer à se développer dès l'âge de 10 mois et jusqu'à 10 ans, mais on recense la majorité des cas entre 2 et 5 ans, avec des évolutions très variables par la suite [74, 84].

Vers l'âge de 3-4 ans, beaucoup de chiens atteints montrent un changement subtil de couleur de leur fond d'œil, avec une zone du tapis allant du jaune vert ou orange relativement brillant à une apparence plus fade. Une atténuation vasculaire généralisée va souvent de paire. Le signe ophtalmologique le plus précoce de la maladie correspond à l'apparition de petits foyers circulaires bruns bilatéraux dans la partie temporale de la zone du tapis. Leur nombre s'accroît et ces foyers s'étendent alors à travers la zone du tapis (partie non pigmentée de l'épithélium pigmentaire rétinien), en direction médiale. C'est leur fusion qui les rend alors visible par examen du fond d'œil de l'animal. Le degré d'atrophie vasculaire du nerf optique est variable et aucune anomalie n'est visible dans la zone sans tapis (partie de l'épithélium pigmentaire rétinien pigmentée par la mélanine).

Les fonds d'œil restent normaux jusqu'à l'âge de 2-3 ans environ [83], mais les électrorétinogrammes (ERG) montrent des réponses fortement réduites ou totalement absentes dès 5 semaines pour certains chiots. En fait, chez certains chiens atteints, il n'est possible d'enregistrer que la réponse des cônes, néanmoins réduite en amplitude, alors que celle des bâtonnets est totalement absente. Aucune vague de réponse a ou b n'est observée dans l'obscurité, ce qui révèle un déficit sévère de fonctionnement des bâtonnets. En présence de forte lumière, les réponses aux stimulations de 30 Hertz (Hz) sont réduites de 50 à 70%. La vague c de l'ERG montre un profil caractéristique de lésions du RPE, avec une latence extrêmement longue.

Ce défaut dans la photo transduction des bâtonnets a été expliqué par des modifications structurales du RPE, sous la forme de larges inclusions en région centrale du fond d'œil, provoquant la désorganisation du segment extérieur de la neurorétine en périphérie de la zone du tapis [7]. Les inclusions présentent dans le RPE ont tendance à rapidement confluer et la dégénérescence périphérique des photorécepteurs en périphérie à s'accroître. Il a été possible de prouver que la région centrale du RPE atteinte par les inclusions était appauvrie en cellules et en épaisseur. Ainsi, les changements sont plus sévères en zone centrale concernant le RPE, alors qu'ils le sont en périphérie concernant la neurorétine et les photorécepteurs associés.

- Les dystrophies rétiniennes héréditaires sont, chez l'Homme, la cause génétique la plus fréquente de cécité adulte [119]. Dans l'amaurose congénitale de Leber, qui regroupe un ensemble de dystrophies à mode de transmission autosomique récessif, les rétines des nouveaux-nés atteints apparaissent généralement normales, avec parfois un léger déficit de fonctionnement. Habituellement la vision est présente à la naissance, mais se dégrade durant la croissance pour aboutir souvent à une cécité complète. Cette perte de vision est fréquemment associée à un nystagmus, oscillation involontaire des yeux où la phase lente éloigne la fovéa (zone de la rétine où la vision des détails est la plus précise, la fovéa est située dans le prolongement de l'axe optique de l'œil) de la cible visuelle (objet), et la phase rapide agit pour ramener la fovéa vers l'objet [61]. Plus de 45 nystagmus ont été caractérisés, dont les étiologies sont diverses et peuvent survenir dès ou après la naissance. Le nystagmus, lorsque présent, peut être accompagné d'une perte ou d'un déficit des réflexes photomoteurs, de photophobie, d'hypermétropie et du signe de Franceschetti (comprenant les manifestations d'une démangeaison oculaire, telles que le frottement), pathognomonique [106]. L'acuité visuelle des personnes atteintes excède rarement 20/400.

L'apparence du fond d'œil est extrêmement variable. Alors que la rétine apparaît initialement normale, une rétinopathie pigmentaire est fréquemment observée un peu plus tard au cours de

l'enfance. Les ERG sont typiquement non détectables ou sévèrement subnormaux. Le traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires est uniquement palliatif et vise à améliorer le confort visuel des patients et en aucun cas à stopper ou traiter les lésions oculaires malheureusement évolutives [106].

3 – Pourquoi espérer de la thérapie génique?

Dès son essor, la thérapie génique a fortement intéressé les généticiens investis dans les maladies oculaires, qui ont vu en elle un outil prometteur de traitement des affections pour lesquelles le gène défectueux était identifié et plus particulièrement lorsque cette anomalie n'affectait qu'un seul tissu ou organe [85]. Les maladies oculaires héréditaires en font partie pour certaines, c'est pourquoi beaucoup d'espairs ont été mis sur la thérapie génique *in vivo*, l'œil étant un organe facilement accessible doté d'une protection immunitaire spécifique pour ses structures internes, comme par exemple la rétine. Entre le segment externe des photorécepteurs et le RPE se trouve l'espace subrétinien, qui présente deux particularités immunitaires avantageuses: il protège d'une part les greffes tissulaires du rejet immunitaire et permet d'autre part aux antigènes locaux de diffuser par voie systémique [85, 110].

Le Briard, race prédisposée à la mutation du gène RPE65, a été rapidement considéré comme un potentiel énorme en tant que modèle pour des essais de traitements (comme le transfert de gène) de certaines formes sévères de cécité chez l'enfant, faisant intervenir ce même gène. Nous allons voir quelle a été la chronologie des avancées expérimentales ayant mené aux succès récemment enregistrés.

4 – La thérapie génique chez le Briard, de ses débuts à aujourd'hui

a- Etude phénotypique détaillée de la RPED

Avec la découverte de la prédisposition du Berger de Brie à la dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien via des lignées comportant des homozygotes symptomatiques, il a d'abord été envisagé de caractériser cette affection, tant au niveau de son évolution clinique que des lésions histologiques qui lui sont associées. De plus, les équipes de recherche ont établi un ensemble d'outils et de tests nécessaires au diagnostic et à la connaissance du degré d'atteinte des animaux étudiés.

- Dans la littérature, il est possible de trouver ces premiers travaux sur la compréhension de la RPED dès 1989 [84], par l'équipe suédoise de Kristina Narfstrom.

Une portée de neuf Briards âgés de 10 mois, ainsi que leurs parents, ont été utilisés. Certains chiens présentaient une cécité dans la pénombre (en lumière scotopique) selon leur éleveur, mais aucun autre problème de santé apparent. Il semblait que leur vision s'améliorait en lumière photopique (du jour), et les signes n'auraient pas vraiment évolué depuis la naissance. Après un examen clinique général, un examen ophtalmologique a été réalisé sur chacun, incluant le test des réflexes photomoteurs, un parcours jonché d'obstacles à parcourir en lumière scotopique puis photopique et un examen du fond d'œil (figure 48). Enfin on a pratiqué un électrorétinogramme sur chaque animal (sous anesthésie fixe). Afin de tester le fonctionnement des bâtonnets, les Briards ont été mis dans la pénombre 45 minutes avant la mise en place des stimuli lumineux. Le fonctionnement des cônes a ensuite été évalué sous lumière photopique. Les résultats graphiques et numériques ont été comparés à ceux d'un beagle de un an non atteint de RPED (figure 49).

Figure 48: Apparence normale du fond d'œil d'un Briard de 10 mois atteint de RPED [84]. Le fond d'œil apparaît normal.

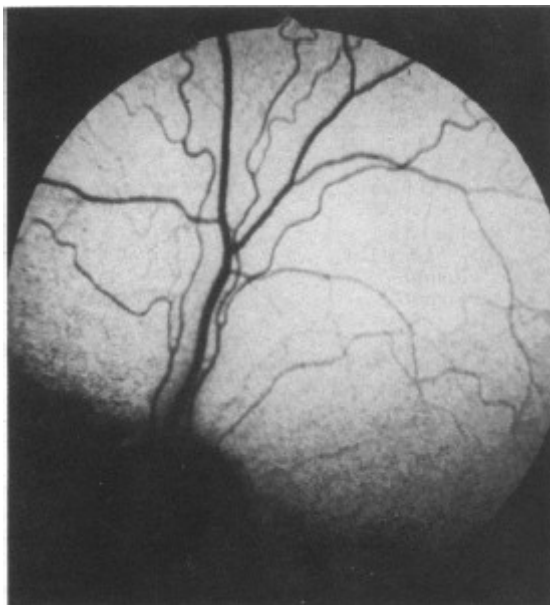
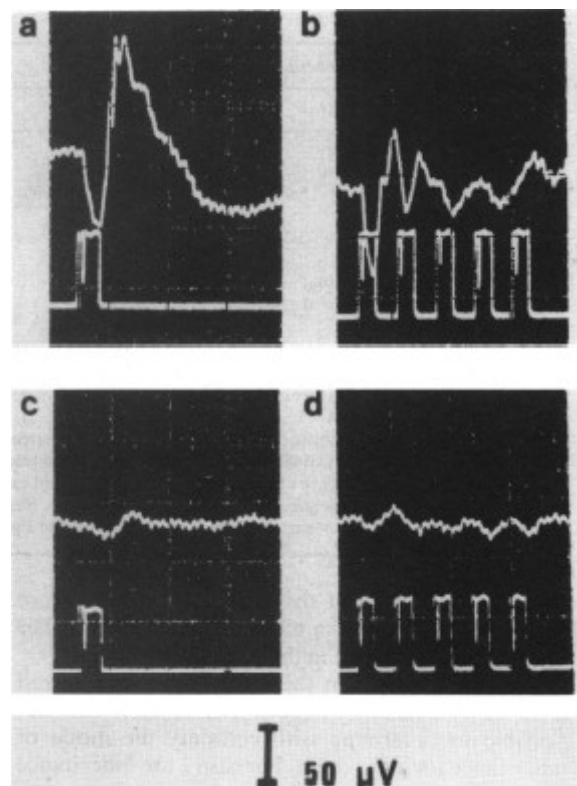


Figure 49: (a) ERG normal en lumière atténuée; (b) Réponse d'un œil de chien non atteint à une stimulation de 30 Hz; (c) ERG de faible amplitude en lumière atténuée chez un chien atteint; (d) Réponse subnormale à une stimulation de 30 Hz sur un œil de chien atteint [84].



Parallèlement, quatre patients humains âgés de 6 à 12 ans présentant une cécité progressive en lumière scotopique diagnostiquée comme étant la cécité congénitale stationnaire nocturne (CSNB), ont subi les mêmes examens.

Les résultats ont montré les signes suivants:

- des réflexes photomoteurs et examens du fond d'œil normaux.
- des tests comportementaux permettant clairement de différencier les animaux atteints des non atteints. Dans une pièce peu éclairée, les chiens RPE65 ^{-/-} ont cherché leur chemin en utilisant essentiellement leur odorat, se heurtant fréquemment aux obstacles. Par contre, le retour en lumière photopique a effacé les signes de désorientation chez tous les individus.

- les animaux dont le test par le parcours d'obstacles a montré des anomalies ont présenté des ERG modifiés, comparativement à un ERG normal. Avec un faible stimulus lumineux, aucune réponse n'a été enregistrée, ce qui prouvait bien qu'il n'y a pas de réponse au niveau scotopique. Avec une intensité maximale, la réponse obtenue a tout juste été détectable, et correspondait à l'activité (néanmoins réduite) des cônes.

Concernant les enfants, les résultats ont été comparables, à savoir que les ERG confirmaient les tests comportementaux en lumière scotopique : deux des quatre patients montraient des anomalies, avec une onde a nettement réduite en amplitude et une négativité sur le tracé derrière l'onde b. Le fonctionnement des cônes était par ailleurs subnormal chez tous les individus.

Ainsi, ces premières études comparées de la RPED chez le Briard et de la CSNB chez l'Homme ont permis de montrer l'intérêt des tests comportementaux et de l'ERG comme outils diagnostics du dysfonctionnement majeur des bâtonnets.

- Il faut attendre 1996 pour qu'une équipe anglaise tente d'expliquer les lésions évolutives du fond d'œil observées chez certains sujets atteints de RPED [74].

Les yeux de Briards non atteints, de Briards atteints de RPED et d'un ensemble de chiens croisés et Beagle normaux ont été examinés. Des coupes histologiques ont permis de comparer la structure rétinienne des Briards atteints avec l'évolution normale due à l'âge de la rétine chez des individus sains. La microscopie fluorescente a permis de mettre en évidence que lors de RPED il y avait accumulation d'inclusions de lipofuscine-like auto fluorescente dans le RPE. Ces inclusions, initialement présentes dans les cellules non pigmentées de la zone du tapis, envahissaient progressivement toutes les cellules pigmentées du RPE.

Par ailleurs, cette expérience s'intéressait également à la dégénérescence de la neurorétine, en prouvant la perte graduelle de la couche externe et l'atrophie subséquente de la rétine interne. La perte des premiers photorécepteurs au niveau périphérique de la rétine fut accompagnée de la migration de leurs noyaux; ce phénomène est néanmoins également retrouvé lors du vieillissement de toute rétine. Le taux de renouvellement des bâtonnets dans le segment antérieur rétinien a été estimé en mesurant le taux d'incorporation de leucine radioactive injectée dans le vitré, mais aucune différence significative n'a pu être observée d'un échantillon à l'autre. Enfin, les chercheurs ont tenté

de mesurer l'activité de l'acide phosphatase dans le RPE, *in vitro*, et ont ainsi prouvé qu'il existait des variations régionales comparables chez les chiens croisés sains et les Briards atteints.

Les résultats ont permis d'écarter deux hypothèses, à savoir que la RPED puisse être due à une augmentation du taux de turnover des bâtonnets du segment externe rétinien (et donc à une augmentation du travail phagocytaire), ou à une insuffisance primaire en enzyme lysosomale. Ces travaux ont été pionniers quant à l'utilisation de techniques telles que l'histochimie ou la microscopie fluorescente pour la compréhension des lésions secondaires à la RPED.

- Il a été constaté que de nombreux chiens et personnes atteints de dégénérescences rétiniennes héréditaires présentaient parallèlement des taux sanguins en acides gras poly insaturés longue chaîne diminués. Cette découverte a conduit l'équipe suédoise de Kristina Narfstrom en 1997 à tenter de savoir si de telles modifications métaboliques étaient présentes dans le cas particulier de la RPED du Briard [7].

Chez des Briards suédois d'âges différents (allant de 2 à 48 mois) et atteints de RPED a été analysée la composition en lipides et en acides gras des compartiments et tissus suivants : plasma, rétine et épithélium rétinien pigmentaire (RPE). Aucune différence significative entre la composition en lipides et en acides gras dans le RPE et le plasma de chiens atteints et non atteints n'a été observée. Par contre, les rétines des chiens malades et sains ont montré des résultats différents, à savoir que les Briards atteints de RPED y avaient plus de phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol et moins de phosphatidylcholine que les chiens sains. Les rétines des chiens affectés ont montré, de plus, des taux plus faibles pour les acides gras suivants: 22:5n-3 et 22:6n-3, et des taux plus élevés pour 18:2n-6, 20:4n-6 et 22:5n-6. De plus, la part totale d'acides gras n-3 était significativement plus basse dans les rétines atteintes de RPED et celle des acides gras n-6 significativement plus élevée.

Cette étude a apporté la preuve que le modèle canin et plus précisément le Briard était un bon choix dans l'analyse des dégénérescences rétiniennes héréditaires accompagnées d'un défaut de métabolisme des acides gras poly insaturés rétiniens. Le contenu en acides gras des rétines des chiens atteints de RPED ressemblait à celui rencontré dans les rétines lors de déficience en acide gras n-3.

b – Analyse moléculaire de la RPED

- Ce n'est qu'en 1998 que les bases moléculaires et génétiques de la RPED du Briard ont été élucidées. Un pedigree de Briard suédois avec des chiens atteints de RPED a été étudié. Les chiens affectés avaient des modifications notables de leur RPE.

Le recours à la PCR (Polymerase Chain Reaction), a permis de caractériser l'ADNc (complémentaire) du gène canin RPE65. Les chercheurs se sont orientés vers ce gène car il avait été décrit comme impliqué dans la dystrophie rétinienne juvénile dont il avait été montré que la Briard atteint de RPED était un bon modèle [112]. L'ADNc obtenu comprenait 1724 nucléotides et la protéine issue de sa traduction avait un poids moléculaire de 61 kDa (selon des prédictions). Le pourcentage d'homologie à l'échelle des acides aminés entre la protéine codée par le gène RPE65 canin et humain était de 98%, et de 89% à l'échelle des nucléotides pour l'ADNc de RPE65.

Par comparaison des ADNc de chiens atteints et de chiens sains, les chercheurs ont identifié la mutation responsable de la RPED du Briard. L'amplification par PCR de l'ADNc de RPED a révélé la présence d'une délétion homozygote de quatre bases (les nucléotides 487 à 490 AAGA) dans la région de l'ADNc correspondant à l'exon 5 du gène [3]. Ce même réarrangement homozygote a été trouvé chez tous les Briards atteints, du pedigree étudié. La délétion entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée probablement non fonctionnelle. La structure de la protéine RPE65 a été modélisée en 2006 [49] et il semblerait qu'elle soit impliquée dans le métabolisme des rétinoïdes (pigments visuels). En l'absence de RPE65 fonctionnelle (ou rétinoïde-isomérase-I) le rétinal-11-cis n'est pas synthétisé et les cônes et bâtonnets dégénèrent [52].

En conclusion, la haute conservation du gène RPE65 au cours de l'évolution laisse penser qu'il exerce un rôle hautement spécifique dans la vision des mammifères. Une fois que la mutation a été caractérisée et reliée directement à la RPED chez le Chien, il a été envisageable de tenter d'utiliser le modèle canin pour la compréhension et le traitement des maladies homologues chez l'Homme. En tant qu'animaux au gabarit moyen, les chiens sont en effet particulièrement intéressants pour tester différents traitements nécessitant des interventions chirurgicales minutieuses, telles que la transplantation de RPE, les injections intraoculaires ou la thérapie génique.

c – Premier essai de thérapie génique

- Les bases moléculaires de la RPED ayant été identifiées, c'est en 2001 que le premier essai de thérapie génique sur le modèle canin est décrit [2]. Conscients de l'origine génétique commune que partagent l'amaurose congénitale de Leber (chez l'Homme) et la cécité nocturne stationnaire ou CNSB (chez le Briard), les chercheurs ont utilisé un vecteur dérivé de l'AAV (*adéno-associated virus*) portant le gène RPE65 sauvage (non muté), l'ensemble étant alors nommé AAV-RPE65, afin de restaurer la vision de Briard atteints de RPED.

Les cellules du RPE provenant des yeux d'un Briard atteint de RPED et d'un chien sain ont été cultivées séparément. Les cellules RPE65 ^{-/-} du Briard ont été infectées par l'AAV-RPE65. Par immunohistochimie, il a été montré que les cellules transformées qui en avaient résulté avaient un marquage positif pour le gène RPE65. La modification des cellules RPE^{-/-} a été confirmée, ainsi que l'expression par la cellule du gène RPE65, au moyen de la PCR et de la technique de Western Blot (mise en évidence des protéines) respectivement.

Le vecteur AAV-RPE65 ayant fait la preuve de son efficacité *in vitro*, les AAV-RPE65 ont alors été injectés dans l'espace sub-rétinien par voie intraoculaire chez trois chiens RPE65 ^{-/-}, et dans l'humeur vitré pour trois autres chiens RPE65^{-/-}. Un suivi par électrorétinogramme 3 à 4 mois après l'opération a mis en évidence une amélioration significative de la fonction rétinienne sur les yeux traités par voie sub-rétinienne: les amplitudes maximales enregistrées représentaient environ 16% de celles des chiens sains pour l'activité des cônes et des bâtonnets. A l'inverse, aucune différence sur les ERG n'a été constatée entre les chiens ayant reçu une injection dans le vitré et les chiens non traités. Des tests comportementaux quatre mois après l'opération ont également été conduits: sous faible lumière, un chien ayant reçu dans l'œil droit une injection sub-rétinienne et dans l'œil gauche une injection dans le vitré n'arrivait à éviter que les objets venant de sa droite. Enfin, pour corrélérer l'expression du transgène aux changements de fonction visuelle, un œil traité par voie sub-rétinienne 99 jours auparavant a été énucléé. La PCR a prouvé que l'ADN transféré était toujours présent dans les cellules de la région traitée [2].

Cette étude est la première à montrer que la thérapie génique permettrait de restaurer la vision chez le Chien, modèle animal d'une rétinopathie humaine. Alors que des travaux précédents

avaient envisagé de retarder la dégénérescence rétinienne, celle-ci démontrait la récupération définitive de la fonction visuelle, prouvée à la fois par des mesures comportementales et physiques.

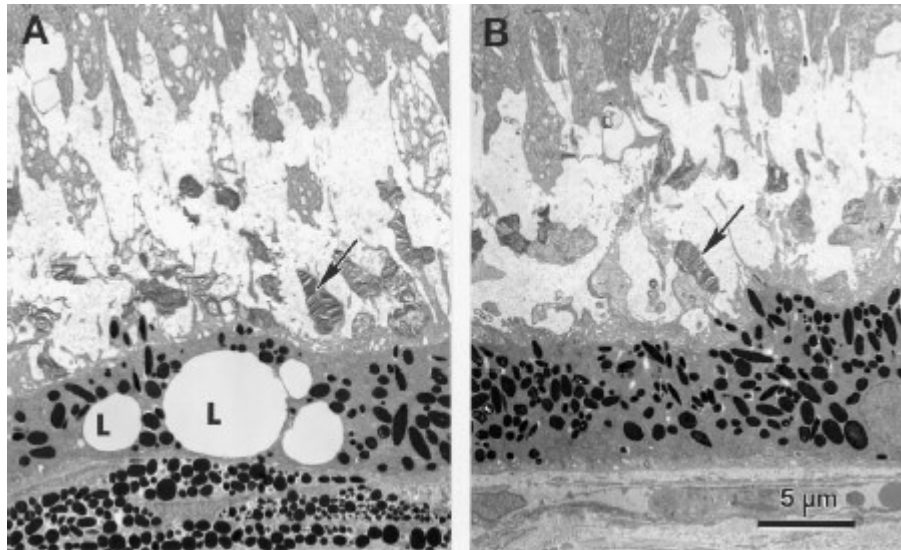
d – Le Chien, un modèle pour la thérapie génique de la RPED

- Une expérience quelque peu similaire a été réalisée en 2003 par l'équipe du Dr Narfstrom, afin de juger de l'efficacité de la thérapie génique via un AAV pour le retour de la vision chez un grand nombre de chiens RPE65 $-/-$, mais aussi pour déterminer les répercussions systémiques et locales causées par ce traitement [85, 86]. La première étude a été conduite sur 12 chiens atteints [85] et la seconde sur 5 chiens atteints [86].

L'ADNc canin correspondant au gène RPE65 a été cloné et introduit dans un vecteur AAV. Parallèlement un vecteur témoin, contenant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) a été produit. Des chiens RPE $-/-$, âgés de 4 à 30 mois, ont été traités par injection sub-rétinienne avec les vecteurs AAV.RPE65 et AAV.GFP respectivement dans l'œil gauche et droit. Des examens pré et post-opératoires ont été effectués, à savoir des examens ophtalmologiques, des bilans sanguins, des tests de vision et des ERG. Deux des 12 animaux RPE65 $-/-$ ont été euthanasiés 3 et 6 mois après le traitement pour effectuer un examen morphologique de leur rétine dans la première étude [85] (figure 50) alors qu'aucun des cinq chiens RPE65 $-/-$ n'a été euthanasié dans la seconde étude [86].

Au début de l'expérience, les chiens RPE65 $-/-$ étaient pratiquement aveugles, avec des ERG de faible amplitude non détectables. Les ERG à 3 mois post-opératoire des yeux traités par AAV.RPE65 ont montré une amélioration de l'onde b : en lumière scotopique de 28% par rapport à l'amplitude normale et de 32% en lumière photopique pour la première étude [85] et de 47% pour la seconde étude [86]. Par contre les yeux traités par AAV.GFP n'ont pas présenté de changement. Aucun effet secondaire systémique n'est observé, hormis des uvéites développées suite aux injections d'AAV.RPE65. Par ailleurs, le recours à l'immunohistochimie a prouvé l'expression du gène RPE65 dans le RPE des yeux traités par AAV.RPE65. La microscopie fluorescente, quant à elle, a révélé qu'il y avait expression de la GFP dans le RPE et, dans une moindre mesure, dans la neurorétine des yeux traités par AAV.GFP. Six à neuf mois après le traitement les résultats des ERG étaient toujours stables [85].

Figure 50 : Rétine en coupe transversale, observée au microscope électronique. A gauche, œil non traité d'un chien atteint de RPED, à droite, œil traité par AAV RPE65. Noter la présence de larges inclusions lipidiques (L) dans le RPE de l'œil atteint, absentes sur la photo de droite [86].



Ainsi, sur 10 des 11 yeux RPE65 ^{-/-} traités par AAV.RPE65, la thérapie génique s'est traduite par la restauration de la vision, la perte du nystagmus pour deux d'entre eux et une amélioration notable et stable des ERG [85]. Au niveau structural, des gouttelettes lipidiques temporaires ont été notées autour du site d'injection de l'AAV.RPE65 (figure 50) et une uvéite s'est développée sur 75% des yeux traités. Ce dernier effet secondaire pouvait être imputable à la réponse immunitaire induite par la protéine issue de l'expression du gène RPE65 [85].

- Les derniers travaux publiés concernant la RPED du Briard sont parus en 2006 [61]. Ils s'intéressaient au nystagmus présent souvent très tôt chez beaucoup de chiens RPE65 ^{-/-}. Ils ont montré qu'il était possible d'utiliser l'enregistrement des mouvements oculaires comme indicateur efficace de la restauration de la vision après thérapie génique.

Deux groupes de chiens ont été formés: un groupe non traité et atteint de RPED et un groupe atteint et traité par thérapie génique avec l'AAV.RPE65. Les mêmes mesures ont été faites sur chacun, à savoir qu'une fois leur tête fixée sur un dispositif expérimental (figure 51). Les chiens ont

été incités à fixer un objet distant (les angles varient de $\pm 15^\circ$ horizontalement et $\pm 10^\circ$ verticalement). Les enregistrements des mouvements oculaires ont été faits par deux techniques différentes, la réflexion infrarouge et la vidéo. Les résultats de 3 chiens non traités, 4 traités, et 3 avant et après thérapie génique ont été analysés au moyen du logiciel NAFX (*eXpanded Nystagmus Acuity Function*), qui fournit un moyen d'objectiver l'acuité visuelle, puisque fondé sur la mesure indirecte de la centralisation de la fovéa sur l'objet cible [61].

Figure 51 : Station d'enregistrement des mouvements oculaires des Briard [61].



Les résultats ont montré que pendant l'expérience, les yeux des animaux non traités ont présenté un nystagmus classique de large amplitude ($\pm 3^\circ$ horizontalement, $\pm 1,5^\circ$ verticalement), avec des oscillations pendulaires dans les plans horizontaux et verticaux, qui les empêchaient de garder l'objet centré sur la fovéa (région de l'œil où la densité en photorécepteurs est la plus importante). Certains chiens non traités présentaient également des oscillations de haute fréquence (6-9 Hz) et de faible amplitude (0,5 à 1°). Dans les mêmes conditions, aucun nystagmus n'a été noté chez les chiens traités avec succès (figures 52 et 53). Seules persistaient quelques ondes de très faible amplitude qui n'empêchaient pas les yeux de garder l'image cible dans sa zone centrale (fovéa). Il est intéressant de noter que le traitement par thérapie génique unilatéral a permis les mêmes résultats, c'est-à-dire la disparition bilatérale du nystagmus. D'un point de vue comportemental, les chiens traités ont été capables de franchir un parcours jonché d'obstacles

beaucoup plus facilement qu'avant l'intervention, chose dont les animaux non traités sont restés incapables.

Figure 52: Enregistrement des mouvements horizontaux (en haut), verticaux (au milieu) et de la trajectoire du nystagmus (en bas) sur les deux yeux d'un chien atteint de RPED [61].

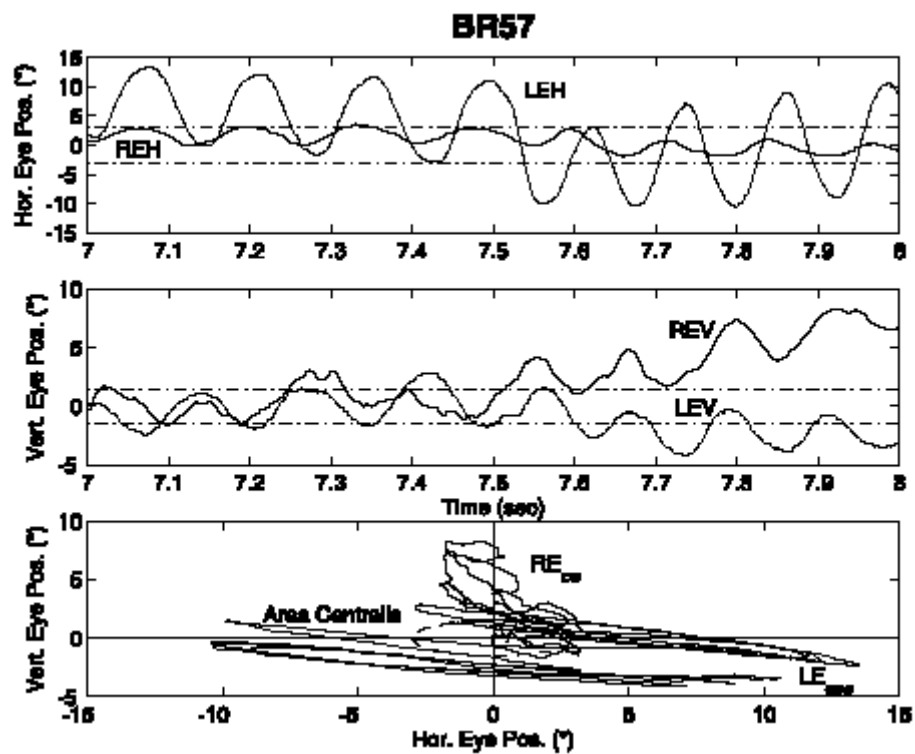
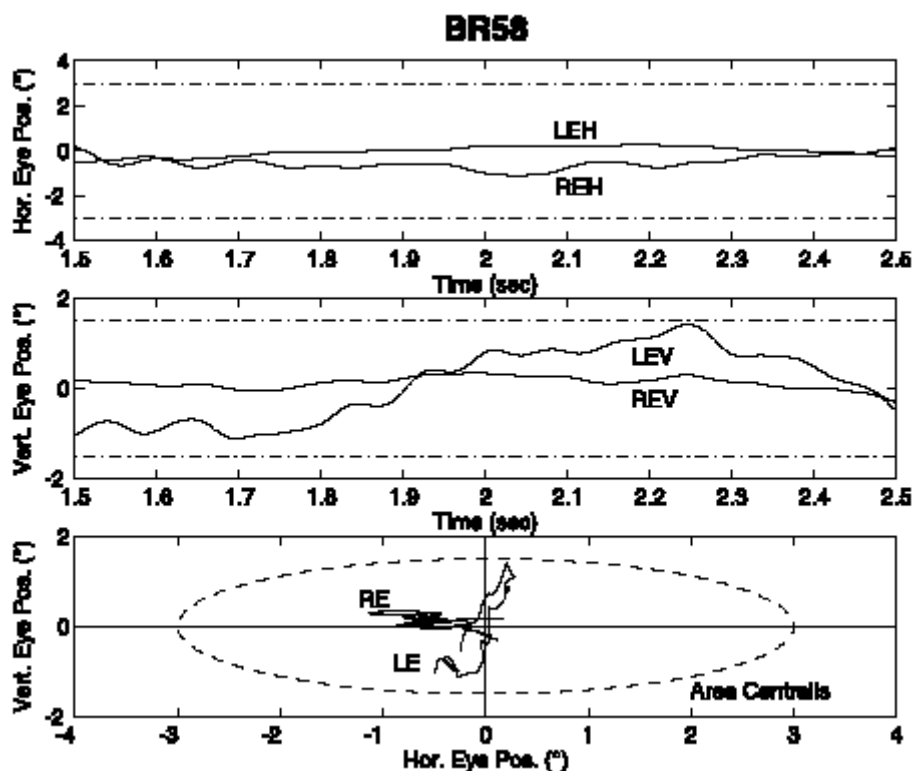


Figure 53: Enregistrement des mouvements horizontaux (en haut), verticaux (au milieu) et de la trajectoire du nystagmus (en bas) sur les deux yeux d'un chien traité par thérapie génique lors de l'expérience [69]. Noter l'absence de nystagmus soutenu dans les trois plans, permettant à la fovéa de rester centrée sur l'œil.



Ainsi la thérapie génique a permis de restaurer non seulement la fonction rétinienne mais a réduit également le nystagmus de telle sorte qu'il n'était plus visualisable cliniquement dans 90% des cas. L'amélioration du nystagmus, prouvée par le NAFX, constitue donc un outil intéressant objectivant l'amélioration visuelle suite à la thérapie génique [61].

La dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien chez le Briard, due à une mutation du gène RPE65, a montré son intérêt en tant que modèle pour les dystrophies oculaires chez l'Homme, en particulier l'amaurose congénitale de Leber. En effet, les essais de thérapie génique entamés dès 2001 et utilisant un vecteur AAV contenant le gène sauvage RPE65, ont prouvé qu'il était possible de restaurer la vision des chiens traités. Plus de 50 chiens ont jusque là été traités (en dehors du

cadre expérimental) avec un taux de réussite de 95%. Des essais cliniques en phase I sont en cours chez l'Homme aux Etats-Unis, avec là aussi utilisation du gène RPE65. Néanmoins, seules les personnes atteintes d'amaurose de Leber âgées de plus de 18 ans ont été autorisées à subir cette expérimentation thérapeutique, qui par conséquent écarte les formes juvéniles dont les lésions sont moins évoluées.

B – La myopathie de Duchenne chez le Golden Retriever

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie humaine qui se caractérise par une grande faiblesse musculaire apparaissant dès l'enfance et conduisant irrémédiablement au décès des personnes atteintes vers la deuxième ou troisième décennie de la vie [29]. Les recherches sont intenses dans ce domaine non pas en raison de l'importante fréquence de la DMD dans la population (un garçon sur 3500 à la naissance) mais du fait de sa gravité et du caractère incurable de cette maladie. L'engouement pour le Téléthon et les multiples actions de l'Association Française contre les Myopathies (AFM) sont des exemples qui témoignent de l'intérêt porté à la fois par la communauté scientifique et par la population à cette maladie héréditaire.

De nombreux modèles animaux ont été décrits [28, 92, 116], dont la souris et le Golden Retriever qui partagent avec l'Homme le même support génétique [28, 30]. Le chien GRMD, pour *Golden Retriever Muscular Dystrophy*, est reconnu comme modèle canin de la DMD pour de nombreuses raisons. Après avoir évoqué les mécanismes pathologiques et les manifestations de la DMD chez l'Homme et chez le Chien, nous ferons le point sur les avancées en thérapie génique qui font aujourd'hui du Golden Retriever un modèle incontournable pour la DMD.

1 – La dystrophine

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et sa forme moins sévère, la dystrophie musculaire de Becker (BMD) sont deux maladies héréditaires rencontrées, entre autre, chez l'Homme et chez le Chien. Elles affectent l'appareil musculaire dans sa globalité et se traduisent par une sévère atrophie musculaire, des contractures et des déformations du squelette. Ces deux dystrophies sont dues à des mutations d'un gène porté par le chromosome sexuel X, qui code une protéine localisée en temps normal sous le sarcolemme (le sarcolemme correspond à la membrane plasmique de la cellule musculaire squelettique) et appelée dystrophine. Dans cette partie nous exposerons les principaux éléments concernant cette molécule, son gène, ses interactions avec

d'autres protéines et ses rôles supposés, à l'origine des conséquences observées dans la DMD et la BMD lorsqu'elle est mutée [70].

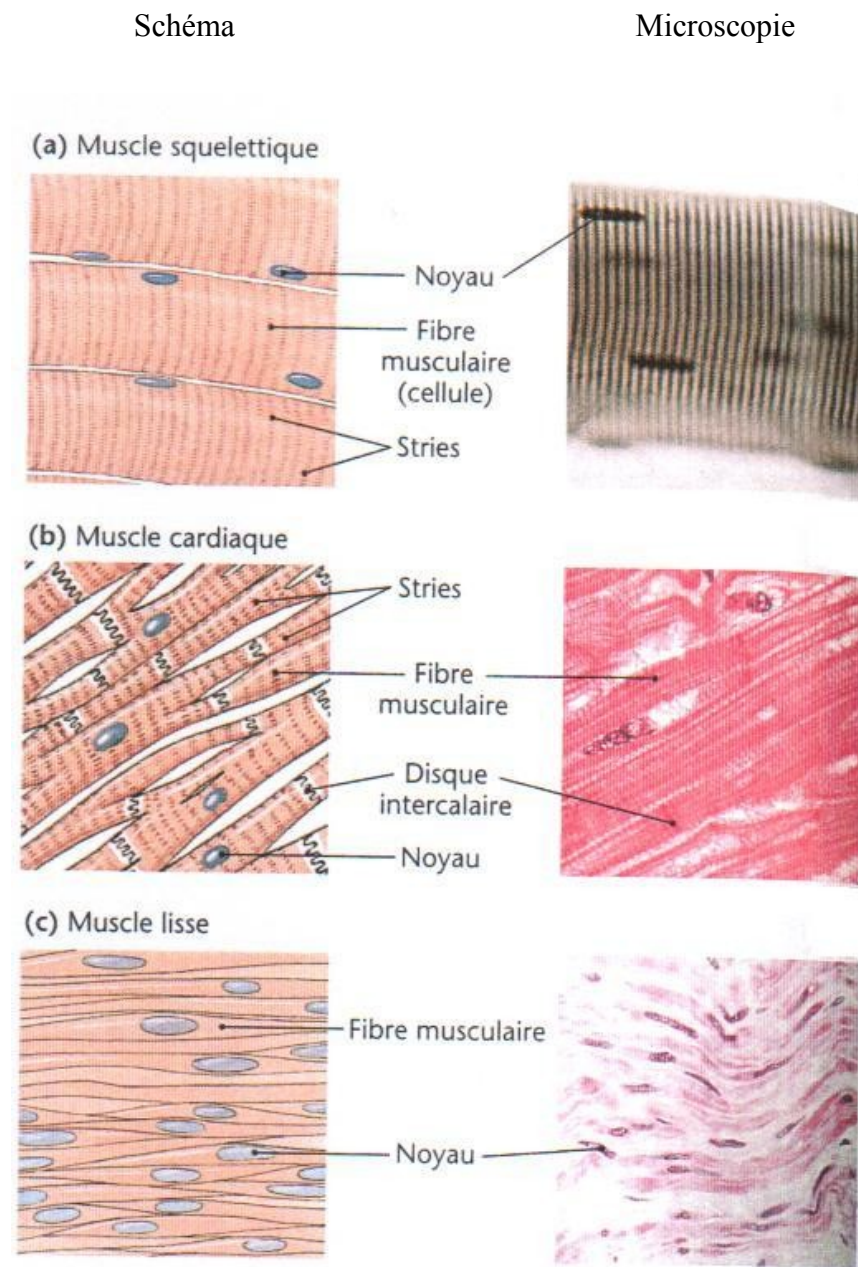
a – Structure et fonction de la cellule musculaire

Afin de mieux cerner la physiopathologie de la DMD, il est utile de rappeler rapidement les particularités structurales et fonctionnelles d'une cellule musculaire. Celles-ci sont communes à l'Homme et au Chien.

- Organisation cellulaire

Il existe trois types de tissus musculaires chez l'Homme et le Chien : les muscles squelettiques, cardiaque et lisses. La plupart des muscles squelettiques s'insèrent sur des pièces osseuses du squelette permettant les mouvements corporels. Le muscle cardiaque se trouve uniquement dans le cœur. Les muscles squelettiques et cardiaque sont des muscles striés. Le muscle lisse est le principal muscle des organes et conduits internes comme l'estomac, la vessie et les vaisseaux sanguins. Il ne fait pas partie des muscles striés (absence de stries à l'observation au microscope) (figure 54).

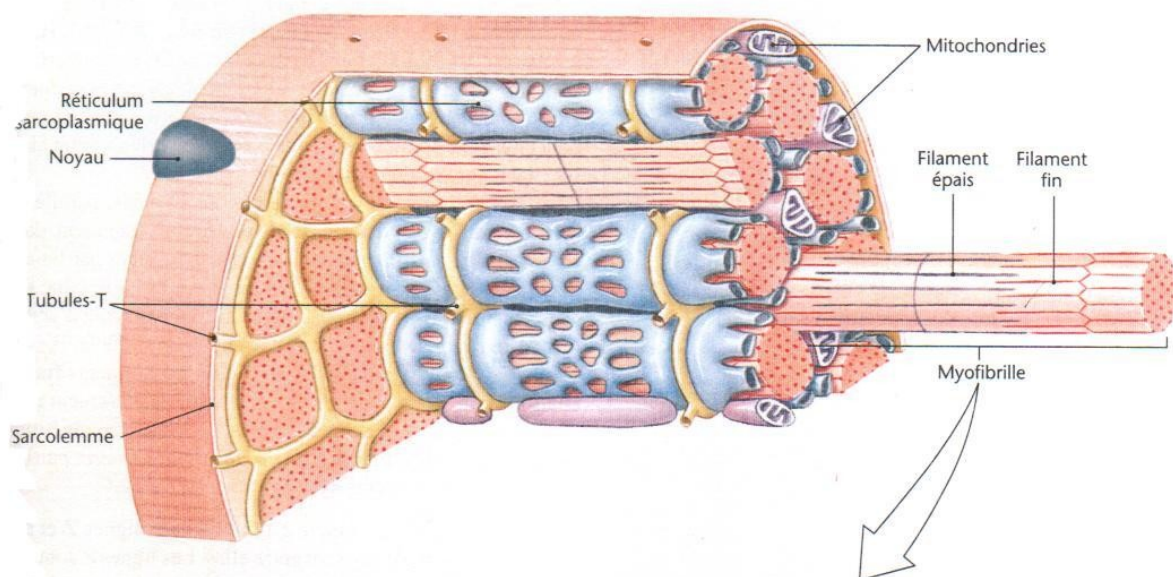
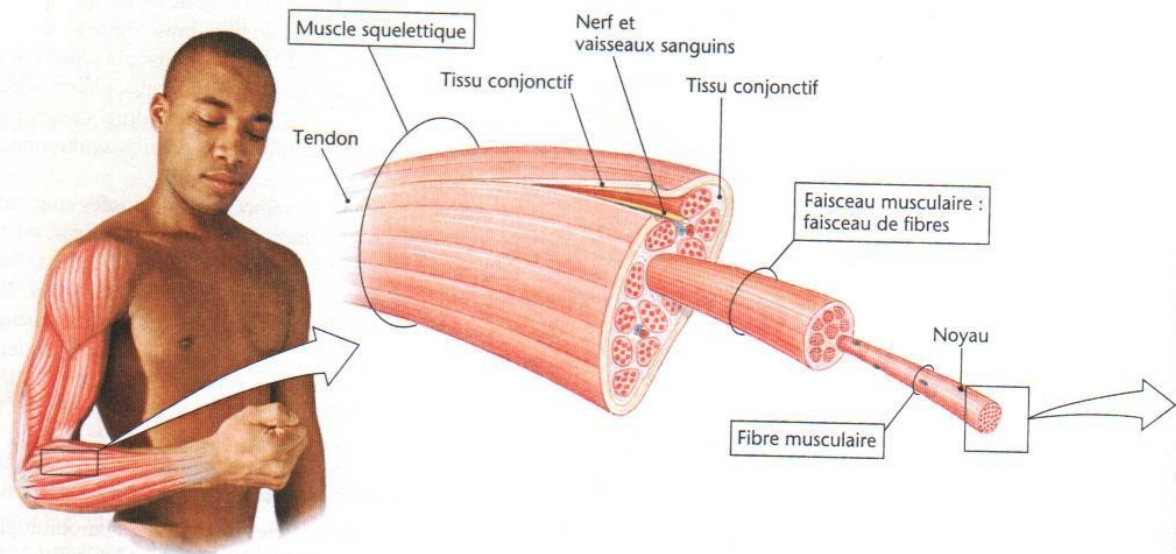
Figure 54: Les trois types de muscles [37].



Les muscles squelettiques représentent environ 50% de la masse corporelle d'un individu. Les cellules musculaires constituent donc la plus importante population de cellules ayant un rôle commun [70]. Une fibre musculaire (ou myocyte) résulte de la fusion de plusieurs cellules indifférenciées à noyau unique [13, 103] (figure 55). Les trois-quarts du volume sarcoplasmique (ou cytoplasmique) sont occupés par les myofibrilles, cylindres parallèles, allongés dans le sens de la cellule, de même longueur mais de faible diamètre (environ 1 micromètre) [15]. Chaque myofibrille

est constituée de l'enchaînement de filaments épais (myosine) et de filaments fins (actine). C'est l'alternance de filaments d'actine et de myosine qui est responsable des striations longitudinales visibles dans le sarcoplasme [37]. Lors de la contraction musculaire, les myofibrilles subissent une diminution de leur longueur via un pontage entre les filaments d'actine et de myosine [33].

Figure 55: Anatomie microscopique d'une fibre musculaire squelettique [37].



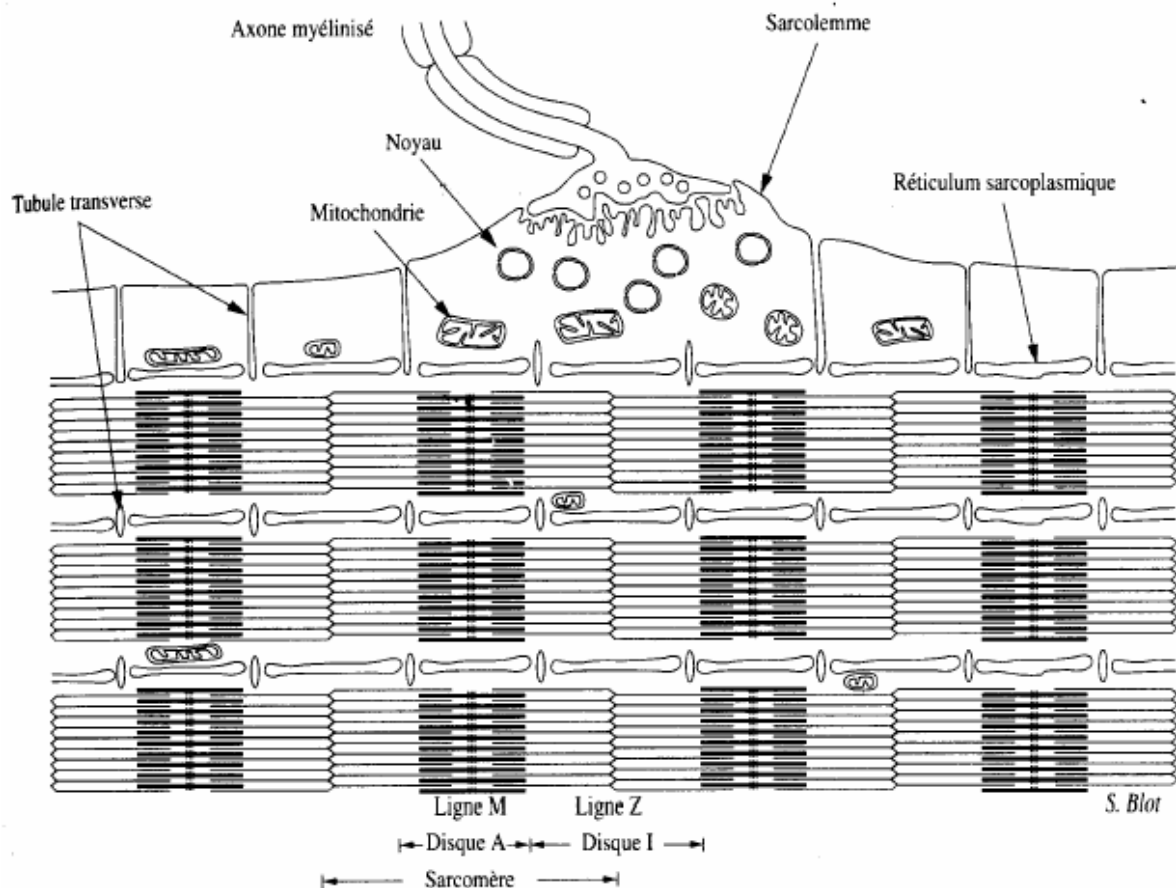
Les autres structures intracellulaires, repoussées en périphérie sous le sarcolemme, sont représentées essentiellement par les noyaux, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et diverses protéines permettant le maintien de la structure cellulaire et la contraction musculaire (comme par exemple la dystrophine). Cette dystrophine est présente au niveau du sous-sarcolemme, et relie les filaments d'actine à un grand complexe de glycoprotéines (appelé DGC) qui traverse le

sarcolemme de part en part. Le DGC (Dystrophy Glycoprotein Complex) est ainsi connecté du côté cytoplasmique à la dystrophine et du côté extracellulaire à la laminine [70].

- L'environnement de la cellule musculaire (figure 56)

Des cellules satellites, petites et situées entre la lame basale et le sarcolemme, servent à la régénération cellulaire lorsque le besoin s'en fait sentir, par division puis spécialisation. D'autre part, il existe des zones de jonction entre les nerfs et le muscle, appelées plaques motrices, dont le rôle est primordial dans la conversion du signal bio-électrique en signal biochimique lors de la contraction. Enfin, la lame basale suit précisément les contours du sarcolemme, et contient la laminine, protéine en contact indirect avec la dystrophine cellulaire.

Figure 56: Architecture d'une fibre musculaire dans la région de la plaque motrice [14].



- Les différents types de fibres musculaires striées [37]

Au sein d'un même muscle se trouvent des fibres différentes du point de vue de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles:

- Les fibres de type I, dites lentes (ou rouges), sont riches en mitochondries et fonctionnent en aérobie.
- Les fibres de type II, dites rapides, utilisent la glycolyse anaérobie.

C'est le type de myosine qui est responsable de cette classification et il est important de noter que le rapport des différentes fibres est constant dans un muscle à l'état normal, alors qu'il varie lors de myopathies.

- La croissance du muscle après la naissance [14]

Il n'y a pas d'élaboration de nouvelles myofibrilles lors de l'accroissement du volume musculaire. En effet, la croissance en longueur s'accompagne d'un allongement des myofibrilles par adjonction de filaments d'actine et de myosine, la croissance en largeur par augmentation de la masse sarcoplasmique et du nombre de noyaux (via les cellules satellites).

b – Le gène de la dystrophine et ses produits

Le gène de la dystrophine est un des plus grands gènes actuellement connus, toutes espèces confondues. Situé sur le bras court du chromosome X, il s'étend sur 2,5 mégabases (donc 2,5 millions de paires de bases) et contient 79 séquences codantes (exons). A lui seul, il représente 1% de la longueur totale du chromosome X [59, 82, 100]. L'ARNm (ARN messenger) produit après transcription des exons comporte 14 000 paires de bases [70]. Le gène est régulé par 8 promoteurs différents, chacun permettant la synthèse d'un isoforme de dystrophine différent [36, 100].

La dystrophine est formée de 3685 acides aminés et son poids moléculaire est de 427 kD pour une longueur de 175 nanomètres. Les différents isoformes de la dystrophine, protéines de longueur variable et contenant différents segments de la molécule de base, sont spécifiques de tissus [76]. Par exemple, la M-dystrophine se trouve dans les muscles lisses, squelettiques, cardiaques, ainsi que dans les cellules gliales [66, 82].

c – Rôles de la dystrophine

Son principal rôle serait essentiellement la stabilisation de la membrane en permettant l'amarrage du cytosquelette et l'organisation de la distribution des glycoprotéines membranaires. Nous verrons plus loin que les principales suppositions concernant les fonctions de la dystrophine découlent des effets de son absence [82].

2 – La dystrophie musculaire de Duchenne chez l'Homme

Les premières descriptions d'une maladie atteignant le système musculaire ont été faites par Guillaume Armand Duchenne de Boulogne en 1861, qui donnera plus tard son nom à la myopathie que l'on connaît. Ce n'est qu'en 1987 que l'on explique les symptômes par l'absence de dystrophine dans les cellules musculaires et que l'ADNc du gène est identifié [20].

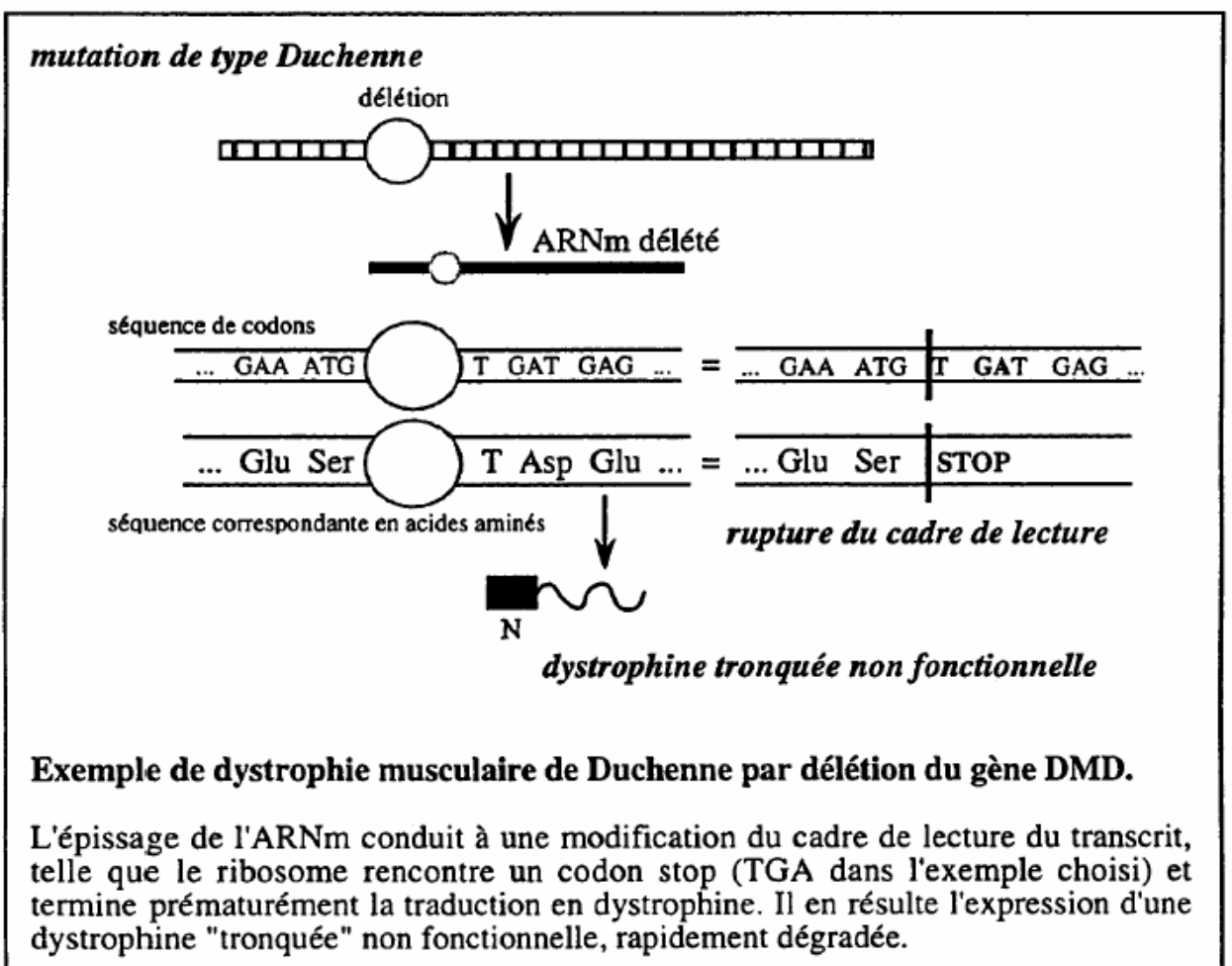
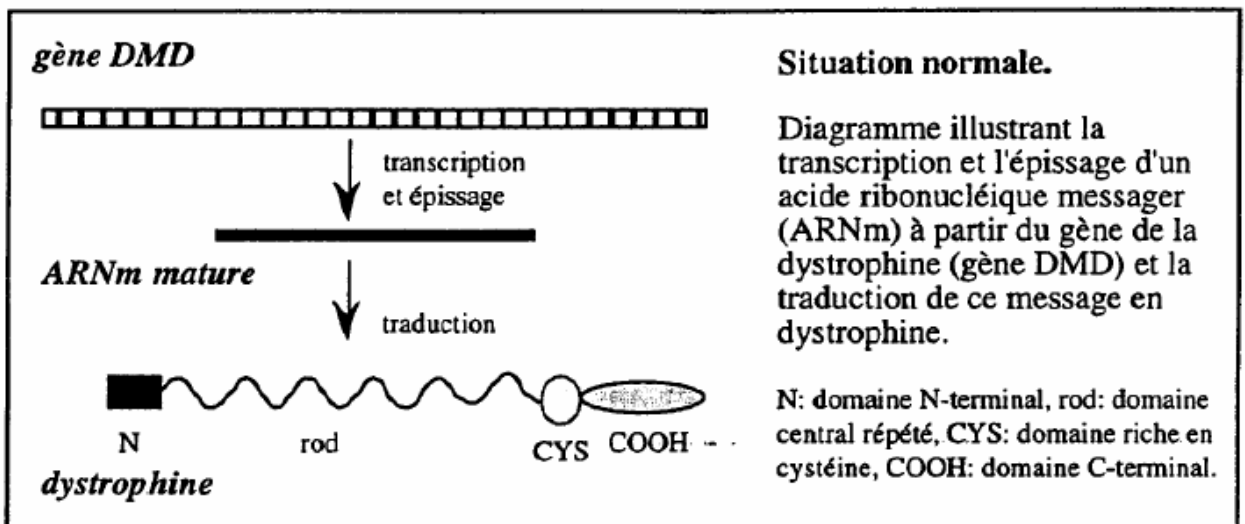
a – Origines et transmission de la maladie

Les dystrophies musculaires liées à une anomalie de la dystrophine vont d'une forme très grave, la maladie de Duchenne ou DMD à une forme plus légère, la maladie de Becker ou BMD [70]. La DMD représente la forme la plus grave et la plus fréquente chez l'Homme (30% des cas de dystrophie musculaire [101] et elle atteint un garçon sur 3500 à la naissance).

Ces deux maladies sont dues à des mutations du gène de la dystrophine et dans la DMD cette protéine est absente en position sous-sarcolemmale des fibres musculaires squelettiques [70]. En 2001, 216 mutations différentes du gène DMD ont été répertoriées comme étant à l'origine de dystrophinopathies et depuis la liste s'allonge [82]. Plus de 65% des cas de myopathie de Duchenne et 85% des cas de dystrophie de Becker résultent d'une délétion détectable (de grande taille, entre 6 et 2000 kb) dans les parties codantes du gène DMD ou d'une duplication d'une partie du gène; les autres cas sont dus à des mutations de petite taille (inférieure à un exon) [100].

Les mutations à l'origine de la DMD, pour la plupart et quelque soit leur taille, aboutissent généralement à une désorganisation des triplets de codons de l'ADN et de l'ARNm produit à partir du gène DMD muté [82], entraînant une perte du cadre de lecture. Apparaît alors un codon stop prématuré qui empêche la production de la protéine complète et normale (figure 57). Lors de BMD par contre, la séquence de nucléotides resterait codante, et le cadre de lecture serait donc conservé. La protéine produite serait simplement plus courte [4, 13].

Figure 57: L'hypothèse de la rupture du cadre de lecture dans les cas de DMD [82, 93].



La fonction de la dystrophine demeure encore aujourd'hui assez mal connue. Deux hypothèses principales tentent d'expliquer la pathogénie de la DMD [66]:

-l'hypothèse structurale, qui suggère que l'absence de cette dystrophine, protéine réunissant matrice extra-cellulaire et cytosquelette, aboutit à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique des cellules musculaires. Fragilisée, cette dernière autoriserait un flux rentrant de calcium à l'origine de l'activation de protéases, sources de la nécrose des fibres musculaires [66].

-l'hypothèse de l'agrégation des canaux ioniques suggère que l'absence de dystrophine entraîne une absence d'organisation du cytosquelette qui normalement participe à l'agrégation des canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs [66].

Ces deux hypothèses ne s'excluent néanmoins pas mutuellement.

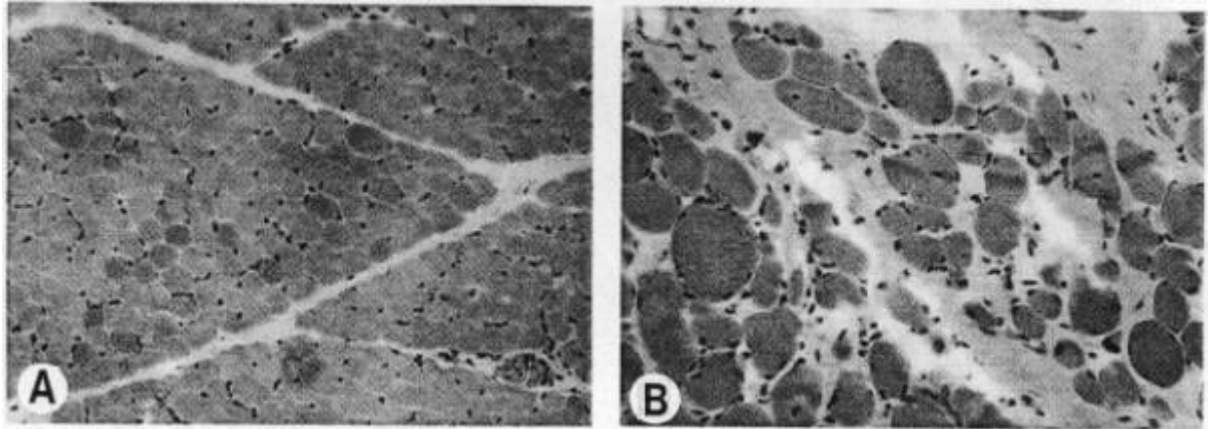
Enfin, la transmission de la DMD se fait sur un mode récessif lié au chromosome X, c'est pourquoi la quasi totalité des cas sont des hommes. Les femmes, elles, sont dites conductrices lorsqu'elles sont hétérozygotes et sont à l'origine de la majorité des cas par transmission de la mutation à leur(s) fils.

b – Présentations clinique et histologique succinctes de la DMD

L'évolution de la maladie chez l'Homme suit deux périodes: la première durant les dix premières années où la marche est conservée, la deuxième où la station debout devient impossible et qui se termine par le décès de l'individu [93]. En parallèle des lésions musculaires caractérisées majoritairement par une atrophie des muscles proximaux des membres, de la ceinture pelvienne, du tronc et de l'abdomen, différents systèmes sont atteints. L'atteinte cardiaque, souvent précoce (5 ans), peut aboutir à des troubles du rythme et une cardiomyopathie dilatée parfois létale vers 20 ans. A noter que 30% des patients environ présentent un retard mental, objectivé par un quotient intellectuel de 80 [59]. Des déformations asymétriques de la colonne vertébrale, aggravées par la position assise, interviennent entre 11 et 16 ans [17].

D'un point de vue histologique, les conséquences de l'absence de dystrophine sont visibles après biopsie. On observe généralement une variabilité importante dans le diamètre des fibres musculaires squelettiques. Les muscles présentent des zones de fibrose et d'inflammation, signes de dégénérescence. Certaines fibres présentent des noyaux au centre de la fibre (figure 58).

Figure 58: Sections musculaires observées au microscope électronique (grossissement 40, après cryosection et coloration à l'éosine et l'hémaréose). (A) Section transversale d'un muscle humain sain; (B) Section transversale d'un muscle d'un humain atteint de DMD [59].



3 – La dystrophie musculaire de Duchenne chez le chien GRMD

La possibilité de guérir certaines maladies neuromusculaires d'origine génétique chez l'Homme suppose une meilleure connaissance de la physiopathologie de ces affections. Les recherches actuelles sur la myopathie de Duchenne recourent obligatoirement à des modèles animaux. Divers modèles animaux ont été validés, mais le chien Golden Retriever atteint est le modèle animal le plus proche de l'enfant dystrophique [70], comme nous allons le voir ici.

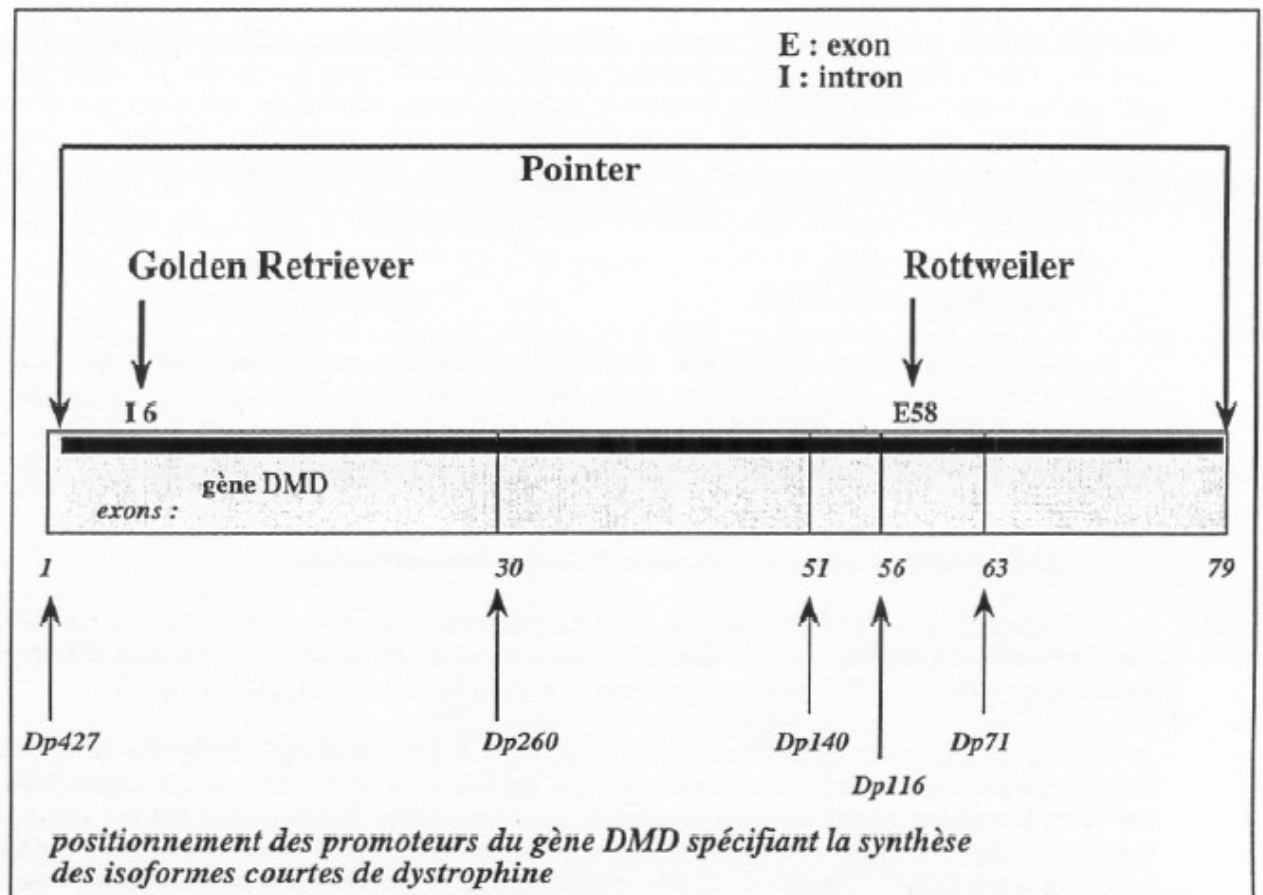
a – Historique et origine de la maladie

Des descriptions sur des cas spontanés sont apparues dès 1958 [79], mais c'est dans les années 80 que l'on crée les premières colonies de chiens malades et que Valentine et Kornegay rapprochent la myopathie touchant leurs Golden Retrievers à la DMD de l'Homme. Ils soumettent comme hypothèse que ces deux maladies, héréditaires, se transmettent via le chromosome X sur un mode récessif. Il faudra attendre 1992 pour que Slarp et son équipe identifient l'erreur sur le gène de la dystrophine à l'origine de la maladie chez le Golden Retriever [109].

Les chiens Golden Retriever dystrophiques présentent une mutation ponctuelle (une base Adénosine remplace une Guanine) dans le site d'épissage de l'extrémité 3' de l'intron 6 du gène DMD (figure 59). Il s'agit d'une mutation non-sens, la délétion de l'exon 7 ainsi créée déplace le cadre de lecture et introduit un codon stop dans l'exon 8. L'ARNm, après transcription et épissage normaux, est tronqué, sa longueur étant estimée à 5% de la longueur de l'ARNm normal. De plus, cet ARNm est présent en quantité très réduite et conduit à la production limitée d'une dystrophine

tronquée de 390 kD [14, 109]. La DMD a été retrouvée dans d'autres races, comme l'indique la figure 59 [87].

Figure 59: Positionnement des mutations canines connues sur le gène DMD [82].



Chez les chiens mâles et les femelles homozygotes malades, aucune dystrophine de longueur totale n'est retrouvée dans les muscles striés squelettiques et cardiaque. Elle est exprimée en quantité réduite chez les femelles hétérozygotes [15, 30, 31].

b – Descriptions clinique et lésionnelle de la myopathie de Duchenne chez les chiens GRMD

On distingue deux formes de la maladie : la forme néonatale fulminante, qui correspond à une forme sévère, précoce et létale de la myopathie et la forme classique, qui nous intéresse ici. Elle

apparaît chez les mâles de deux mois environ sous forme de fatigabilité accompagnée d'une démarche anormale et de l'incapacité d'ouvrir complètement la mâchoire. On note un retard de croissance global et les taux de créatinine kinase sont de 50 à 100 fois supérieurs à la normale [69].

Peu à peu, le chiot adopte une posture caractéristique, les postérieurs ramenés sous le corps, les jarrets en adduction et les coudes en abduction, la démarche se faisant de plus en plus raide. Ces signes s'aggravent progressivement jusqu'à l'âge de 6 mois, puis se stabilisent :

- l'amyotrophie des muscles du tronc, des temporaux et des muscles appendiculaires, ainsi que les contractures dues à la fibrose provoquent des déformations prononcées de la colonne vertébrale. On retrouve également fréquemment plantigradie et palmigradie.
- la prise alimentaire est fortement compromise par les difficultés de préhension, mais aussi par la macroglossie, les troubles de la déglutition pharyngée et œsophagienne (des broncho-pneumonies sont possibles par fausse déglutition). On observe parfois des méga-œsophages ou des hernies hiatales secondaires.
- enfin, vers l'âge de trois mois apparaissent des difficultés respiratoires imputables à l'insuffisance contractile du diaphragme [3, 115].

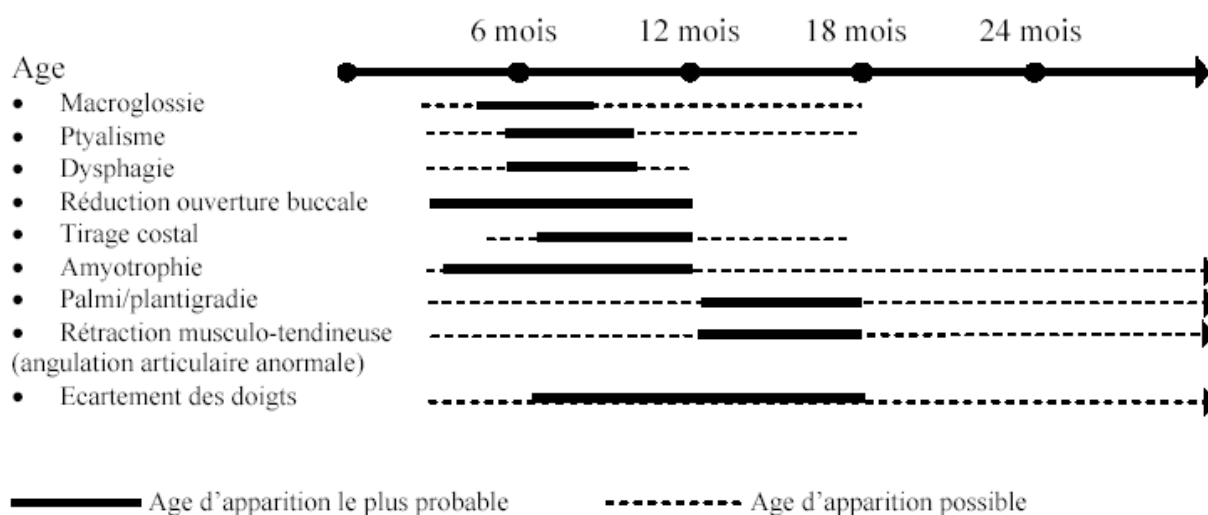
De 3 à 6 ans, les symptômes évoluent peu ou progressivement et le recours à l'euthanasie est souvent inévitable en raison de l'apparition d'une insuffisance cardiaque terminale [115] (figures 60 et 61).

Figure 60 : Photographie d'un chien mâle atteint par la GRMD (animal de 8 mois) [33].



Cliché S. Blot, Laboratoire de Neurobiologie

Figure 61: Age d'apparition des différents symptômes chez le chien atteint par la GRMD [95].



Les lésions histologiques, que nous ne détaillerons pas ici, sont comparables à celles retrouvées chez les patients atteints de DMD, à savoir des fibres de taille hétérogène, contenant une quantité anormalement élevée de calcium en position sous-sarcolemmale, en état d'hypercontraction

puis de nécrose. On observe également une fibrose marquée et une infiltration interstitielle par du tissu adipeux [93, 115].

4 – Le chien Golden Retriever, un modèle parfait pour la myopathie de Duchenne de l'Homme?

Afin d'envisager des thérapies dans les maladies neuromusculaires, il est indispensable de valider de véritables modèles génétiques animaux. L'utilisation d'animaux domestiques dont les maladies sont similaires à celles des Hommes constitue ainsi une étape vitale et incontournable pour aboutir à des succès thérapeutiques [33]. Dans le cas de la myopathie de Duchenne, le chien GRMD suscite l'intérêt particulier des chercheurs, en thérapie génique bien sûr, mais aussi pour la compréhension de cette affection héréditaire dans son ensemble. La grande similarité des symptômes entre l'homme et le Golden Retriever n'est pas l'unique raison de l'intérêt de ce modèle.

a – Comparaison clinique Homme / Chien [95]

L'évolution clinique de la maladie chez le Chien se rapproche beaucoup de celle chez l'Homme :

- les premiers symptômes locomoteurs apparaissent entre 2 et 4 ans chez l'Homme, âge où la marche devient normalement bien coordonnée, correspondant aux 6-8 semaines du chien. Par contre, on peut noter précocement l'hypertrophie de certains muscles distaux des membres, ce qui n'est pas le cas chez le Chien, même si les muscles proximaux peuvent paraître fermes et développés en comparaison avec les autres muscles amyotrophiés. Par contre, l'amyotrophie progressive impliquant la plupart des groupes musculaires apparaît dans les stades évolués de la maladie dans les deux espèces.

- les déformations articulaires sont du même ordre avec, en particulier, l'apparition d'une cyphose et d'une lordose chez le Chien, secondaires à la faiblesse musculaire. On observe également chez le Chien une courbure médiale du dernier arc costal secondaire à la fibrose du diaphragme.

- les taux de CK sont très élevés dans les deux espèces, bien que chez le Chien le taux de CK, déjà très élevé à la naissance, laisse supposer l'initiation des lésions musculaires *in utero*. Les taux de CK restent élevés chez le Chien même pendant les stades avancés de la maladie, indiquant qu'il y a toujours des phénomènes de nécrose. De même que chez l'Homme, le taux de CK

augmente avec l'exercice et diminue progressivement avec l'évolution de la maladie. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une corrélation entre le taux de CK et la gravité de la maladie.

- l'atteinte cardiaque dans les deux espèces apparaît tardivement cliniquement, bien que des lésions du myocarde puissent être observées précocement.

- de même que chez l'Homme, il pourrait y avoir, chez le Chien, une relation entre la sévérité de l'atteinte et la taille des fibres musculaires ainsi que le rythme de croissance (les chiens de petite taille sont moins gravement atteints et les femelles également).

Par contre, on retrouve tout de même quelques particularités d'espèce, puisque :

- il n'y a pas de perte de la fonction ambulatoire chez le Chien du fait de sa quadrupédie. Chez l'Homme, les enfants sont généralement en chaise roulante vers l'âge de 8-10 ans, ce qui aggrave les déformations articulaires et secondairement les difficultés respiratoires. Le Chien de ce fait semble vivre plus longtemps.

- l'atteinte œsophagienne, très fréquente chez le chien (méga-œsophage), n'est généralement pas décrite chez le patient DMD.

- le retard de croissance n'est pas décrit chez l'enfant DMD. Chez le chiot, il est particulièrement marqué dans les premiers stades de la maladie quand les phénomènes de nécrose sont très importants et donc la demande en protéine pour régénérer la fibre musculaire très élevée. Les difficultés de préhension et de déglutition de la nourriture sont également à mettre en cause ainsi qu'un phénomène de compétition au sein de la portée (les chiots sains ont plus facilement accès à la nourriture).

- l'atteinte cérébrale semble avoir beaucoup moins de conséquences chez le Chien que chez l'Homme. En fait, il est difficile d'évaluer les pertes d'apprentissage chez le chien GRMD.

- la forme suraigüe de la maladie n'a pas été observée chez l'Homme. Chez ce dernier, les différentes formes cliniques plus ou moins sévères dépendent de mutations différentes du même gène et non d'une évolution clinique différente pour une même mutation. La forme progressive du GRMD semble se rapprocher le plus de la DMD humaine.

Les similitudes entre les dystrophies musculaires humaine et canine sont évidentes, tant sur le plan clinique que lésionnel et génétique. Un tel degré d'homologie n'est pas retrouvé chez les deux autres modèles animaux, la souris *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*) et le chat HFMD (*Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy*) [19, 23].

b – Utilité du modèle GRMD [70]

- Le chien myopathe, un animal difficile à élever au sein d'une colonie

L'obtention de chiots GRMD est limitée. En effet, les saillies naturelles par des mâles atteints sont difficiles à mener étant donné leur atteinte locomotrice. On préfère utiliser des femelles hétérozygotes, ou alors on a recours à l'insémination artificielle.

De plus, le maintien en vie des chiens atteints est délicat et nécessite une surveillance quotidienne. Les décès sont fréquents et se produisent souvent de manière fulgurante. Tout ce nursing représente un coût financier non négligeable, même sur une colonie de petite taille.

Enfin, le faible nombre de portées par chienne et par an, associé à cette mortalité élevée, font que le nombre de myopathes sur lesquels les études sont faites demeure réduit.

- Le Golden Retriever se prête bien aux expérimentations

Le volume musculaire à traiter est équivalent entre le chien Golden Retriever et les patients atteints, ce qui donne une bonne indication de la réussite des traitements lors d'essais thérapeutiques.

De part son gabarit, de multiples examens complémentaires sont permis, tels que biopsies musculaires, échographie, ECG, EMG...

Les avantages du modèle canin pour la myopathie de Duchenne humaine sont indéniables et nombreux. Ils ont permis et permettront une meilleure compréhension de cette atteinte héréditaire au pronostic sombre, mais aussi des essais thérapeutiques dont les perspectives sont prometteuses à l'heure actuelle. De grands efforts sont réalisés sur la recherche de nouvelles thérapies pour les dystrophies musculaires et les autres maladies musculaires dégénératives aussi bien pour l'Homme que pour l'animal [33]. Bien entendu, de nombreux efforts doivent être encore faits avant que ces techniques puissent devenir disponibles en routine [103].

Dans une dernière partie, nous tenterons de dresser un état des lieux des avancées thérapeutiques via la thérapie génique concernant la myopathie de Duchenne.

5 – Myopathie de Duchenne et thérapie génique chez le Golden Retriever : état des lieux et perspectives

La dystrophie musculaire de Duchenne est une myopathie relativement fréquente, invariablement fatale. C'est pourquoi de nombreuses recherches s'orientent vers la thérapie. Les premiers traitements étaient non spécifiques (utilisant essentiellement la corticothérapie sur le long terme), mais depuis 1984 et la découverte du premier modèle animal de dystrophinopathie (le modèle de Souris *mdx*), une révolution des connaissances a eu lieu dans ce domaine. C'est ensuite grâce aux trois modèles animaux actuellement connus que la pathogénie de la DMD a commencé à être élucidée. Et à chaque voie pathogénique découverte correspond un espoir thérapeutique [82].

Le plus pertinent des modèles, le chien GRMD, a fait l'objet de multiples expériences depuis la création des premières colonies. Plutôt que de retracer les différentes avancées connues jusqu'à aujourd'hui, nous ferons un état des lieux sur l'utilisation actuelle de la thérapie génique chez le chien GRMD, en abordant parallèlement les difficultés rencontrées. Enfin, une succincte présentation des avancées sur la DMD, dans des domaines autres que la thérapie génique, permettra d'établir l'état des connaissances actuelles et les succès espérés dans un proche avenir.

a – Utilisation de la thérapie génique chez les chiens GRMD: état des lieux

Deux principes d'implantation de gènes dans les cellules musculaires sont utilisables, à savoir:

- l'injection directe du gène dans le muscle ou à l'aide d'un vecteur non viral (liposome)
- l'injection dans les muscles d'un vecteur viral véhiculant le gène, le vecteur délivrant secondairement le gène dans sa cellule musculaire.

Nous n'aborderons que cette deuxième technique, puisque la première ne permet pas, à l'heure actuelle, une bonne expression des gènes injectés.

- **Utilisation de vecteurs viraux [70]**

- Utilisation des herpes virus simplex

Une fois délétés de leurs gènes non vitaux, ils possèdent une grande capacité de stockage (40 à 50 kb), ainsi l'ADNc du gène de la dystrophine (14 kb) peut y être inséré. De plus, ils peuvent être préparés avec de forts titres et infectent préférentiellement des cellules en divisions (ici les myoblastes).

Néanmoins, ils sont desservis par leurs pouvoir cytotoxique et immunogène; même s'il a été possible de déléter leur génome des gènes les plus nocifs, ce vecteur doit encore être amélioré avant d'obtenir des essais intéressants.

- Utilisation des rétrovirus

Bien que l'infection des myoblastes en division soit très efficace, stable et sans danger, les rétrovirus n'infectent eux aussi que des cellules en cours de division et sont donc incapables d'apporter des gènes à des fibres musculaires matures, différenciées et post-mitotiques. Leur capacité de clonage n'est que de 7,5 kb, et il n'est pas possible de les produire avec un fort titre.

Leur utilisation est donc restreinte à de jeunes patients, où les muscles en croissance ou en phase de régénérescence contiennent de nombreux myoblastes et cellules satellites activées. Actuellement, les essais se penchent plus sur les adénovirus et virus associés.

- Utilisation des adénovirus

Ils sont très intéressants pour la thérapie génique et représentent de nos jours un des vecteurs prometteurs car:

- ils peuvent infecter de façon limitée les cellules musculaires post-mitotiques et de façon extrêmement efficace les myoblastes
- ils sont facilement produits en très grande quantité
- ils présentent un faible risque oncogène ou mutagène

Par contre, leur génome ne permet pas l'insertion de grandes quantités d'ADN, on utilise donc des "mini-gènes" la plupart du temps (forme active raccourcie de la dystrophine).

Différents essais préliminaires avec le gène codant pour la bétagalactosidase (qui permet de faire apparaître une couleur sur les coupes histologiques) ont montré que les adénovirus pouvaient être d'excellents moyens de transférer des gènes durant de longues périodes au niveau du foie, du muscle, du rein ou du cerveau [60]. L'injection de ce gène sur des chiens GRMD a permis son expression dans 76% des fibres musculaires. L'injection du gène homologue à la dystrophine par les adénovirus a permis son expression dans 51% des fibres musculaires sur le site d'injection [60].

A noter que les adénovirus sont aussi utilisés en thérapie *ex vivo* lors du transfert *ex vivo* de myoblastes secondairement réimplantés sur le donneur.

- Utilisation des virus associés aux adénovirus

Ils représentent un des avatars de la thérapie génique. Avec une prédilection pour les cellules musculaires squelettiques qu'ils infectent très efficacement et durablement qu'elles soient ou non en division, ces vecteurs ne déclenchent pas de réaction cellulaire immunitaire [56]. Hélas, deux problèmes se posent:

- la taille du gène transféré est limitée et n'excède pas 4,7 kb. Deux techniques permettent néanmoins de contourner ce problème, la première consistant à diviser le gène de la dystrophine en deux, chaque fragment étant transféré par un AAV, l'ADN étant ultérieurement reconstitué dans la cellule grâce à des propriétés particulières des AAV [56, 59]. La deuxième consiste à réduire la taille du gène de telle manière qu'il permette la synthèse d'une "mini-dystrophine" dont la structure réduite à l'essentiel puisse redonner un fonctionnement normal aux muscles traités. Chez l'Homme, cette technique permettrait de passer de la forme DMD à la forme BMD.

- l'utilisation de la voie intra-musculaire ne permet d'obtenir des résultats qu'un millimètre autour du site d'injection [56]. Deux études [56, 59] ont montré qu'il était possible de surmonter cet inconvénient en dissociant partiellement la barrière formée par le tissu conjonctif grâce à des injections de hyaluronidase ou en utilisant la voie intraveineuse avec de l'histamine destinée à perméabiliser les vaisseaux sanguins. Ces techniques transposées chez l'Homme semblent prometteuses.

• **Les problèmes rencontrés [70]**

Nous ne ferons que les énumérer, même si en pratique les chercheurs ont constamment à y faire face.

- les effets toxiques des virus et leur pouvoir immunogène:

De nombreux travaux sont en cours pour tenter de réduire au maximum ce pouvoir dans les fibres musculaires. Cependant, la création de virus délétés par exemple ne doit pas altérer leur capacité de

réplication au risque de les rendre inutiles [55]. Certains auteurs travaillent sur des vecteurs adénoviraux "vides", c'est-à-dire délétés de leurs gènes viraux; ils servent donc juste de boîte de transport au gène de la dystrophine jusqu'à la cellule musculaire. L'absence de réplication sera compensée par la présence de virus "helpers" qui synthétiseront les protéines nécessaires à la réplication de ces virus "vides" et à leur préparation *in vitro* [56]. De telles perspectives sont intéressantes car le vecteur ne synthétisant aucune protéine virale, les rejets liés à la réaction immunitaire sont énormément réduits et une expression prolongée du gène recombiné est alors possible; en outre, ces virus "vides" ont une capacité de clonage de plus de 35 kb ce qui permet l'insertion du gène de la dystrophine entier et d'un promoteur spécifique au muscle.

Les effets thérapeutiques attendus après l'introduction du gène de la dystrophine via un adénovirus conventionnel sont partiellement ou entièrement annulés car les phénomènes immunitaires qui empêchent l'expression du gène à long terme en le détruisant. La réaction immune de l'hôte contre les cellules infectées peut avoir des effets secondaires sur la force musculaire initiale puisqu'elle semble s'attaquer à la fois aux cellules infectées par le virus et à celles qui ne le sont pas.

Parallèlement aux traitements immunosuppresseurs utilisés pour contrecarrer ce pouvoir immunogène, les essais tentent de travailler avec des adénovirus de moins en moins immunogènes.

- la voie d'administration

Il s'agit de la limitation la plus importante de la thérapie génique des maladies musculaires. Les injections intra-musculaires devraient être très nombreuses pour pouvoir traiter un seul muscle dans toute sa longueur et sa largeur puisque la diffusion des adénovirus autour du site d'injection est de 1 à 3 mm. De plus, ces injections sont inenvisageables car inaccessibles sur certains muscles tels que le diaphragme ou le muscle cardiaque.

L'idéal serait de trouver une voie d'administration systémique qui permette de traiter tout le volume musculaire. Des résultats encourageants ont été obtenus en utilisant des injections intraventriculaire, intraveineuse et intrapéritonéale [56], mais il n'est pas encore possible de connaître les effets de l'expression de la dystrophine par différents organes (foie, cellules hématopoïétiques...). La voie systémique est également largement utilisée dans le domaine de la thérapie cellulaire (voir plus loin).

- la quantité de dystrophine nécessaire et sa répartition

Si 20% des fibres musculaires expriment la dystrophine, cela suffit à améliorer significativement l'expression clinique de la maladie. La répartition de cette dystrophine doit être la plus homogène possible afin de potentialiser les effets bénéfiques.

- objectiver une réussite de thérapie génique

Les examens histopathologiques permettent de détecter les signes d'expression du gène introduit ainsi que leurs conséquences sur les fibres musculaires (augmentation de la stabilité cellulaire, du nombre de fibres...). Mais il est difficile de corréler ces changements à une amélioration fonctionnelle.

- la durée d'expression du gène introduit

C'est là aussi un souci; en général l'injection intra-musculaire d'un plasmide ou d'un vecteur viral est suivie de l'expression du gène dans les 2-3 premiers jours. Cette expression augmente fortement jusqu'à un seuil à partir duquel elle décroît, si bien que des biopsies à 1,2 ou 3 mois après l'injection montrent une réduction notable voire une absence totale d'expression de ce gène.

- **Myopathie de Duchenne et thérapie génique : état des lieux [103]**

- Chez le modèle canin

- Amélioration de l'efficacité du transfert de gène grâce à une nouvelle lignée d'AAV modifiés : les adénovirus helper dépendants (HDAd, pour *Helper-Dependant adenoviruses*) sont des vecteurs adénovirus auxquels il manque tout ou partie des gènes viraux. Ils laissent espérer beaucoup concernant la DMD puisqu'ils sont moins immunogènes que les adénovirus délétés jusque là utilisés et peuvent contenir l'ensemble de l'ADNc codant pour la dystrophine [47].

Des vecteurs provenant d'herpès virus de type 1 (HSV-1) sont eux aussi à l'étude. Cela provient de leur capacité à infecter des cellules qui ne sont pas en division comme les cellules musculaires différenciées et à transférer la totalité de l'ADNc codant pour la dystrophine (14 kb). Des études ont montré que des amplicons de HSV-1 peuvent infecter des cellules musculaires en culture différenciées ou non avec un fort taux d'infection. Elles ont aussi prouvé que ces mêmes amplicons sont capables de libérer un transgène de 23 kb. Cette efficacité de transfert génétique combinée à la possibilité de transférer de longs fragments d'ADN font des amplicons HSV-1 un outil idéal pour délivrer des gènes dans un organisme. Néanmoins, les injections par voie intra-musculaire de vecteurs HSV-1 sont inefficaces dans des muscles matures (où les cellules sont différenciées). Il a

été prouvé que la membrane basale des myofibres bloque l'entrée des virions une fois ces derniers captés par les récepteurs de la surface cellulaire. Il apparaît donc que les amplicons HSV-1 seraient efficaces lors de manipulations *ex vivo* en vue de thérapie cellulaire autologue, plutôt que lors d'injections par voie intra-musculaire. Des efforts ont été faits concernant la production d'amplicons dont la transduction est plus stable. Une nouvelle génération d'amplicons hybrides HSV/AAV est capable d'intégrer de grands transgènes jusqu'au site AAVS1 du génome humain. On espère que ces hybrides permettront un tel transfert, sûr et durable, jusqu'aux cellules musculaires [122].

- Un traitement immunosuppresseur de courte durée améliore l'efficacité d'une thérapie génique AAV-micro-dystrophine et diminue la réaction immunitaire chez le chien GRMD :

Le transfert de transgène par vecteurs AAV a été efficace chez des souris *mdx*, modèles animaux pour la DMD. Cependant, il a été prouvé chez le Chien et chez l'Homme que la réponse immunitaire de l'hôte empêchait l'expression durable des transgènes dans l'organisme. La réussite à long terme d'un tel transfert de matériel génétique peut être espérée par l'emploi d'une modulation immunitaire. Des injections directes par voie intra-musculaire d'AAV2 et AAV6 chez des chiens non malades engendrent une meilleure réponse immunitaire face à la capside ou aux protéines de la capside. D'autre part, une brève immunosuppression à l'aide d'une combinaison associant des globulines anti-thymocytes, de la cyclosporine et du mofétil mycophelionate suffit à obtenir une expression durable et efficace du transgène codant pour la micro-dystrophine canine dans les muscles squelettiques de modèles canins pour la DMD. Ces résultats laissent espérer une prochaine application pour des essais cliniques de thérapies utilisant les AAV chez l'Homme [123].

- Chez l'Homme

- Essai américain (Pr. Mendell) de phase I en cours: évaluation de la faisabilité et de la tolérance de l'administration en intra-musculaire d'un AAV-micro-dystrophine chez 6 garçons atteints de DMD. Fin de l'étude prévue en décembre 2008 [103].

- Essai franco-américain (Transgène) de phase I/II en préparation: évaluation de la faisabilité et de la tolérance de l'administration intraveineuse sous pression d'un plasmide de dystrophine complète non vectorisé chez des patients atteints de DMD [103].

Bien que très prometteuse, la thérapie génique reste donc encore expérimentale et difficile à envisager en routine. A la vitesse où vont les découvertes et les réussites, de nombreux espoirs sont néanmoins permis à court terme. Mais c'est avec l'aide de techniques autres que la thérapie génique

qu'il sera sans doute possible, un jour, de traiter la myopathie de Duchenne sur un nombre de patients conséquents.

b – Les nouvelles pistes de recherche

De nouvelles recherches se sont orientées vers la correction réelle (modification de l'ADN) ou artificielle (modification de l'expression du gène) *in vivo* du gène muté de la dystrophine [70].

Il s'agit principalement du saut d'exon et de l'utilisation d'oligonucléotides d'ADN-ARN. Nous aborderons également la thérapie cellulaire et la thérapie pharmacologique de la DMD, même si ces deux disciplines ne font pas partie de la thérapie génique. Elles représentent en effet des techniques d'avenir pour le traitement de la DMD.

- **L'utilisation d'oligonucléotides d'ADN-ARN [10, 97, 103]**

Elle peut avoir deux buts, selon la façon dont elle est réalisée :

- Pour réparer une mutation ponctuelle [13]

L'injection intra-musculaire d'un double brin chimérique d'ADN et d'ARN a permis de corriger la mutation présente dans le gène de chiens GRMD. Le double brin chimérique reconnaît spécifiquement la région de la mutation, des liaisons apparaissent entre le brin chimérique injecté et le brin muté de l'ADN et un échange homologue se produit entre les deux brins liés. Six semaines après l'injection, un transcrit contenant l'exon 7 a été détecté au sein des muscles où avait eu lieu l'injection et plus précisément au niveau des noyaux du site d'injection. La synthèse de la dystrophine a été mise en évidence à la fois en immunoblot et en immunohistochimie et des analyses de l'ADN des muscles injectés ont permis de révéler que la mutation initiale avait bien été corrigée.

Néanmoins ces résultats sont à nuancer, puisque seulement 1 à 2% des fibres musculaires des chiens étaient positives à la dystrophine, ce qui cliniquement ne permet pas d'amélioration [70].

Cette technique permet donc la réparation permanente de mutations ponctuelles présentes dans un gène et l'expression stable et durable d'une dystrophine entière. Mais elle n'autorise que des réparations sur une paire de base d'ADN, ce qui empêche son utilisation sur d'autres types de mutations.

- Pour transformer des délétions hors phase en délétions en phase

Ici le but est de rétablir le cadre de lecture qui est altéré dans la plupart des délétions (à l'origine d'un décalage au niveau du transcrit). Cela se fait par transformation de la séquence d'ADN de façon à ce que la délétion hors phase devienne en phase. En théorie, cela permettrait aux patients DMD de n'avoir que le phénotype léger de la BMD.

Mais de telles manipulations sur un gène aussi grand que celui de la dystrophine sont complexes et les succès ne sont actuellement recensés que chez des souris *mdx*, chez laquelle le déterminisme génétique de la dystrophie ne provient pas d'une délétion comme chez l'Homme [97]. Des oligonucléotides chimériques d'ADN/ARN (« chiméraplastes ») peuvent induire des altérations de bases sur l'ADN, à la fois *in vivo* et *in vitro*. La dystrophie musculaire chez la Souris *mdx* provient d'une mutation du gène de la dystrophine ; la dystrophine alors synthétisée dans les cellules musculaires est déficiente. Pour tester la faisabilité de la thérapie génique utilisant les chiméraplastes sur les dystrophies musculaires, un chiméraplaste (appelé MDX1) a été utilisé pour corriger la mutation dans le gène de la dystrophine chez ces souris *mdx*. Les MDX1 ont été injectées directement dans les muscles des souris malades. Des analyses immunohistochimiques ont révélé la présence de dystrophine fonctionnelle autour des points d'injection. Deux semaines après des injections simples dans le muscle tibial cranial la quantité maximale de dystrophine retrouvée dans tous les muscles représentait 1 à 2% du nombre total de fibres de dystrophine dans ce muscle. Dix semaines après ce pourcentage était le même, suggérant une activité stable de l'oligo. La dystrophine produite chez les souris traitées par les MDX-1 était complète et fonctionnelle. Des analyses par PCR ont montré la présence de transcrits de la dystrophine de type sauvage (donc fonctionnelle et complète) dans les muscles de souris *mdx* ayant reçu les injections de chiméraplastes MDX-1. Ces résultats fournissent une base pour l'étude de la thérapie génique utilisant les oligonucléotides ADN/ARN comme approche thérapeutique des dystrophies musculaires et autres maladies génétiques musculaires [98]. L'application chez l'Homme devra prendre en compte le fait que la dystrophie musculaire humaine provient d'une délétion dans le gène de la dystrophine et non pas d'une substitution.

L'utilisation des oligonucléotides ADN/ARN chez l'Homme devrait alors être entreprise pour transformer des délétions en phase. Une modification des sites d'épissage du gène DMD par ces oligos serait envisageable. Un premier succès a en effet été obtenu chez la Souris en modifiant un site d'épissage de l'exon 23 permettant ainsi la production de transcrits délétés mais en phase du gène DMD. Les transcrits étaient porteurs de délétions internes mais avaient conservé un rôle fonctionnel [11].

- **Le saut d'exon [66, 103]**

Qu'est-ce que le saut d'exon?

Dans environ 65% des cas de DMD, la mutation induit un décalage du cadre de lecture, entraînant la formation d'une protéine dystrophine non fonctionnelle.

Contrairement aux techniques de thérapie génique classiques qui consistent à apporter un gène-médicament au cœur de la cellule pour restaurer la protéine manquante, le saut d'exon a pour objectif de supprimer la partie du gène comprenant l'erreur afin de rétablir le cadre de lecture et permettre à la cellule de fabriquer la protéine absente. La dystrophine produite est plus courte. Mais si les acides aminés manquants ne sont pas essentiels, la protéine peut être fonctionnelle. Il en résulte un passage des symptômes de DMD à ceux moins sévères de dystrophie musculaire de Becker.

Pour induire un saut d'exon, les chercheurs utilisent des petites molécules nommées "oligonucléotides anti-sens ", ou "ARN anti-sens". [66]

Il s'agit d'une voie très prometteuse à l'heure actuelle et de nombreux essais ont déjà et sont tentés à la fois chez l'animal et chez l'Homme.

- **Chez le modèle canin**

- Oligonucléotides anti-sens de synthèse libres ou morpholinos :

Des morpholinos restaurent l'expression d'une quasi-dystrophine chez le chien GRMD, en étant efficaces aussi bien par voie intra-musculaire qu'en intraveineuse. Le traitement d'un chien atteint, par des morpholinos, a amélioré les performances motrices de l'animal. La manipulation de l'épissage de pré-ARNm par des oligonucléotides antisens (AOs) offre de considérables espoirs pour plusieurs maladies génétiques. La DMD en particulier puisque la dystrophine non fonctionnelle résulte de l'apparition prématurée d'un codon stop suite à la survenue d'une délétion dans le gène de la dystrophine. Les AOs peuvent supprimer cette partie du gène comprenant la mutation et rétablir le cadre de lecture, aboutissant à la production d'une dystrophine certes déletée

mais fonctionnelle. Cette dystrophine « partielle » est la même que celle retrouvée chez des individus atteints de la dystrophie musculaire de Becker (forme atténuée de la DMD). Cette approche a été essayée chez les souris *mdx* *in vitro* et *in vivo* ainsi que sur des myoblastes provenant de l'Homme. Une récente expérience correspondait à l'utilisation d'AOs pour produire l'expression de la dystrophine *in vitro* chez le modèle canin GRMD. Elle estimait l'efficacité de trois molécules : le 2'-O-méthyl phosphorothioate (20Me), des oligomères morpholinos phosphorodiamate (PMOs) et des PMOs liés à des protéines (PMO-Pep) pour produire de la dystrophine. La 20Me n'était efficace que pour induire une correction à court terme des transcrits et l'expression d'une dystrophine fonctionnelle n'a pas été détectée. L'utilisation des PMOs s'est également révélée décevante puisqu'elle n'a pas permis d'obtenir des concentrations efficaces de dystrophine dans les cellules traitées. Les PMO-Pep, employés pour la première fois chez un modèle de DMD, ont permis la production de niveaux stables et importants de dystrophine dans les cellules traitées, sans effet néfaste direct sur ces dernières. Ainsi, la production de la dystrophine chez des modèles GRMD offre de nombreux espoirs concernant l'utilisation des AO sur d'autres modèles de la DMD, avant de pouvoir l'envisager chez l'Homme [78].

- Chez la Souris et le Chien

- Oligonucléotides anti-sens vectorisés pour obtenir une production permanente:

- AAV1-U7 (Généthon) : vecteur viral couplé au gène U7 codant la séquence qui restaure l'expression d'une quasi-dystrophine fonctionnelle :

Le saut d'exon utilisant un vecteur AAV1-U7 a été exploré chez des souris *mdx*, modèle préclinique pour caractériser la réponse immunitaire résultant des injections. De plus, des multiples injections ont eu pour but de déterminer si un traitement appliqué à plusieurs groupes de muscles simultanément était possible. Il a ainsi été prouvé que des injections répétées de vecteur AAV1 sont délicates à partir de trois jours suivant la première injection. En effet, l'apparition d'immunoglobulines spécifiques des AAV1 (IgM) et d'IgG dans le sérum des sujets traités neutralise les AAV1 ultérieurement administrés. En bloquant la réponse immunitaire au moyen d'un traitement de 5 jours à base d'anticorps anti CD40, il a été possible d'empêcher la synthèse des anticorps anti AAV1. Ainsi une correction de la dystrophie musculaire dans plusieurs muscles à la fois a été permise [48, 77].

- L'AAV1-U1 (Italie) : vecteur viral couplé au gène U1 codant la séquence anti-sens qui restaure l'expression d'une quasi-dystrophine fonctionnelle (2006) :

Un saut d'exon stable et durable a été obtenu chez des souris *mdx* par injection intraveineuse de vecteurs AAV exprimant des séquences antisens (ARN nucléaire U1). L'emploi de la voie

systémique a permis une colonisation rapide de nombreuses cellules musculaires et par conséquent une restauration significative des propriétés fonctionnelles cellulaires *in vivo* et des taux de créatinine kinase sériques abaissés. Les cellules musculaires traitées ont synthétisé une dystrophine fonctionnelle. Cette étude prouve qu'il est possible d'obtenir l'expression d'un ARN nucléaire au moyen d'un vecteur AAV antisens U1 dans le cadre du traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne [40, 41].

- Chez l'Homme [103]

- Essai hollandais de phase I en cours (J. Van Deuketom) [117]:

Objectif: évaluation de la faisabilité et de la tolérance d'une injection intramusculaire d'ARN anti-sens libres (appelé PRO051) visant au saut de l'exon 51 chez 4 personnes atteintes de DMD.

Méthodes : quatre patients atteints de DMD ont reçu une dose de 0,8 mg de PRO051 injectée dans le muscle tibial cranial. Une biopsie a été effectuée 28 jours plus tard. Ont alors été mesurés la composition de l'ARNm dans les cellules prélevées ainsi que le degré d'expression de la dystrophine.

Premiers résultats: aucun effet secondaire à l'injection n'a été rapporté. Chaque patient a montré un saut d'exon spécifique de l'exon 51 et une expression de la dystrophine au niveau des sarcolemmes dans 64 à 97% des fibres musculaires. Le pourcentage de dystrophine parmi l'ensemble des protéines extraites allait de 3 à 12%.

Conclusions : l'injection par voie intra-musculaire d'oligonucléotide antisens PRO051 a permis la synthèse de dystrophine chez les quatre patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.

Perspectives: administrer le produit par voie intraveineuse.

- Essais en préparation:

- Essai de phase I: évaluation de la faisabilité et de la tolérance d'une injection intramusculaire d'ARN anti-sens libres (morpholinos) chez 9 personnes atteintes de DMD.
- Essai français (Généthon): évaluation de la faisabilité et de la tolérance d'une injection intramusculaire/intraveineuse d'ARN anti-sens vectorisés dans un AAV.

-Traitement des duplications par saut d'exon (stade *in vitro*) [1] :

Méthodes : les cellules musculaires cultivées à partir de patients atteints de DMD suite à une duplication partielle du gène, et donc porteuses de duplications, ont été infectées par des AOs

comportant les exons dupliqués. Les expressions de l'ARN codant pour la dystrophine et de la dystrophine elle-même ont alors été évaluées.

Résultats : Chez deux frères possédant une duplication au niveau de l'exon 44 l'injection a permis le saut d'exon et la production d'un transcrit correct. Le cadre de lecture a été rétabli. Dans des cellules d'un patient présentant une duplication de l'exon 45, l'injection de l'AO a aussi restauré le cadre de lecture et permis la synthèse d'une dystrophine de type sauvage. Par contre, il a été impossible de corriger une duplication allant des exons 52 à 62 en raison de sauts d'exons inefficaces et d'erreurs sur les sites atteints.

Conclusion : Le succès dans la correction des duplications chez les patients atteints de DMD par le saut d'exon dépend des exons ciblés. Les résultats vont de la réussite avec expression d'une dystrophine complète et fonctionnelle, alors que la correction de délétions sur plusieurs exons impose la mise en place d'approches plus délicates et spécifiques.

- **La thérapie cellulaire [103]**

La thérapie cellulaire utilise les cellules souches en les prélevant soit chez le patient à traiter, soit chez un donneur. Une fois purifiées et éventuellement traitées et amplifiées, elles sont alors réimplantées chez le malade pour remplacer les cellules déficientes ou disparues.

-Chez le Chien, la greffe de mésangioblastes (cellules souches dérivées de vaisseaux sanguins) améliore la fonction musculaire chez les chiens GRMD [101]:

L'administration par voie intra-artérielle de mésangioblastes issus de chiens non atteints a permis la synthèse diffuse de dystrophine par les cellules musculaires mais aussi l'obtention de muscles normaux d'un point de vue morphologique et fonctionnel (ce constat a été objectivé par des mesures de contractions sur les fibres musculaires traitées). Cliniquement les chiens GRMD traités sont nettement améliorés et préservent une mobilité. Ces données qualifient les mésangioblastes de candidats pour des thérapies futures sur des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.

-Chez l'Homme plusieurs essais de phase I/II sont actuellement en cours qui visent à injecter par voie intramusculaire des cellules souches de différentes origines à des patients atteints de DMD. Un essai québécois (Pr. Trambly), tout récemment terminé chez un seul patient, a permis d'évaluer la tolérance et l'efficacité d'une transplantation de cellules myogéniques dans trois muscles selon la technique dite de "*high density injection*" [108] :

Un patient de 26 ans atteint de DMD a reçu des cellules musculaires souches « normales » (ne portant pas la mutation dans le gène de la dystrophine) préalablement cultivées *in vitro* et implantées dans l'éminence thénar (saillie musculaire arrondie à la partie antéro-postérieure de la main, sous le pouce), le biceps brachial et dans une partie du muscle gastrocnémien. Les injections, placées à 1 mm l'une de l'autre, n'ont été effectuées que de façon unilatérale. Sur le côté controlatéral ont été réalisées des injections salines témoins. Le patient a subi une immunosuppression avec du tacrolimus. Le protocole de transplantation cellulaire a été correctement toléré et aucune séquelle permanente n'a été induite. Certains sites injectés ont été biopsiés à 1, 14 et 18 mois post-transplantation. Au niveau de la portion traitée du muscle gastrocnémien 27,5% des fibres musculaires exprimaient la dystrophine fonctionnelle un mois après la transplantation et 34,5% 18 mois après la transplantation. Le muscle gastrocnémien controlatéral ayant reçu les injections salines n'exprimait pas de dystrophine fonctionnelle. Ainsi, un protocole d'injections de grande densité a été possible pour des transplantations cellulaires par voie intramusculaire chez un patient atteint de DMD. Il a permis une expression à long terme efficace de dystrophine issue de l'expression des cellules provenant d'un donneur sain.

- **La thérapie pharmacologique [70, 103]**

Nous ne développerons pas cette partie, étant donné la multitude des traitements essayés depuis de nombreuses années et encore aujourd'hui (corticostéroïdes, facteurs de croissance, inhibiteurs de protéases...) chez l'Homme et les modèles animaux.

A noter cependant l'intérêt accordé aux facteurs permettant d'augmenter la régulation de l'expression de l'utrophine. L'utrophine est une protéine naturellement exprimée au niveau de la jonction neuromusculaire des fibres musculaires matures, ainsi qu'au niveau du sarcolemme des cellules musculaires immatures ou en régénérescence. Lors de carence en dystrophine, elle se retrouve exprimée en plus grande quantité au niveau du sarcolemme de la fibre dystrophique humaine et animale. Cette molécule proche de la dystrophine pourrait peut-être compenser l'absence de dystrophine si elle était surexprimée dans les fibres musculaires dystrophiques [68, 81].

Enfin, de nouvelles voies de régulation du fonctionnement musculaire ont été récemment mises à jour, et proposent autant de nouvelles pistes pour la thérapie pharmacologique de la DMD.

Par exemple, la PGC-1alpha, un co-activateur de la réponse musculaire à la stimulation nerveuse, est dérégulé lors de DMD. Le contrôle du niveau de ce co-activateur par des molécules pharmacologiques permettrait peut-être d'améliorer l'état clinique des patients DMD, la surexpression par transgène de cet activateur améliorant la symptomatologie des souris *mdx* [53].

L'utilisation du Chien a été, et demeure encore aujourd'hui primordiale dans la recherche sur la dystrophie musculaire de Duchenne. Même si les essais ont déjà commencé chez l'Homme, il n'en demeure pas moins que les expérimentations les plus poussées se font chez l'animal, pour des raisons éthiques. Les différents types de traitements explorés à l'heure actuelle, dont la thérapie génique fait partie, prouvent qu'il reste encore des progrès à faire avant d'envisager pouvoir soulager de façon notable les patients myopathes.

CONCLUSION

Si le principe fondamental de la thérapie génique est simple puisqu'il s'agit, grâce à la contribution d'un gène aux vertus identifiées, d'améliorer le fonctionnement de cellules, de tissus ou d'organes, sa mise en pratique s'est en revanche avérée beaucoup plus ardue. La mise en place d'essais cliniques chez l'Homme passe par une validation préalable chez le modèle animal. Les avantages offerts par le Chien, modèle se rapprochant étonnamment de l'espèce humaine au niveau de sa physiologie mais aussi du déterminisme de multiples maladies génétiques, en font un modèle très intéressant. Les différents domaines dans lesquels les essais cliniques en thérapie génique canine ont été effectués témoignent des précieuses informations que le Chien peut apporter à la recherche.

Les deux illustrations que sont la myopathie de Duchenne et la dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien sont la preuve de l'intérêt du Chien en thérapie génique. Les essais chez l'Homme sont prometteurs et laissent espérer les mêmes réussites sinon mieux que celles présentées ci-dessus chez le modèle canin. Tout modèle animal ayant des inconvénients, l'entretien de chiens dans le cadre expérimental est contraignant et coûteux, et ne peut être effectué à aussi grande échelle qu'avec le modèle Souris par exemple. Ces obstacles sont largement compensés par les possibilités d'investigation permises par un animal du gabarit d'un Golden Retriever ou encore d'un Berger de Brie, qui se rapproche bien plus de celui d'un Homme adulte. Outre les applications chez l'Homme, les recherches chez le Chien s'intensifient et profitent à l'espèce canine avant tout. De multiples races sont touchées par des maladies génétiques spécifiques qu'il est difficile d'éradiquer par la simple sélection raisonnée des individus mis à la reproduction. La possibilité de guérison que laisse entrevoir la thérapie génique, aussi palliative que soit cette alternative, permettrait de sauver de nombreux individus.

Au-delà de l'intérêt individuel, la thérapie génique soulève de nombreuses interrogations. Par exemple, au travers des manipulations génétiques, sommes-nous capables de défier tout le champ du vivant y compris la formation d'un œuf fécondé ? Est-il éthiquement possible d'envisager intervenir à ce niveau ? Quant à prévenir toutes les anomalies génétiques, nous en sommes bien loin puisque de nouvelles mutations sont créées à chaque génération et le plus souvent dans des familles jusque là indemnes. Cependant, dans l'éventualité où un diagnostic prénatal pourrait être posé,

l'opportunité d'un traitement par thérapie génique *intra utero* est aujourd'hui envisagée mais seulement comme hypothèse de recherche.

De profonds débats relatifs à la définition de l'être vivant et au respect du vivant ont été suscités et demeurent brûlants. Un formidable espoir nous est offert de pouvoir soigner de très nombreuses maladies en joignant le potentiel du transfert de gènes à visée thérapeutique, ou thérapie génique, à celui des cellules souches autologues adultes. Si les obstacles technologiques sont énormes, le bien-fondé de la démarche justifie les efforts nécessaires pour apporter les solutions thérapeutiques à de nombreuses maladies aujourd'hui fatales.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AARTSMA-RUS A. et al. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy, *BMC Medical Genetics*, 2007: 8-43
- 2 - ACLAND GM. et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness, *Nature genetics*, 2001, 28: 92-95
- 3 - AGUIRRE G. et al. Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect, *Molecular Vision*, 1998, 1: 4-23
- 4 - AHN AH., KUNKEL LM. The structural and functional diversity of dystrophin, *Nature Genet.*, 1993, 3(4): 283-291
- 5 - AIUTI A. et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning, *Science*, 2002, 296(5577): 2410-3
- 6 - ALINO SF. et al. Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism, *Gene therapy*, 2007, 14: 334-343
- 7 - ANDERSON RE. et al. Lipids of plasma, retina, and retinal pigment epithelium in Swedish Briard dogs with a slowly progressive retinal dystrophy, *Exp. Eye Res.*, 1997, 64 : 181-187
- 8 - ANDRE C. Les recherches en génétique: intérêts en médecine vétérinaire et humaine, *Le nouveau praticien vétérinaire*, 2007, 88 : 8-20
- 9 - BANNASCH D. Advances in small animal genetics, *Veterinary clinics of North America: Small animal practice*, 1999, 36(3): 461-474
- 10 - BARLETT RJ. et al. In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide, *Nature biotechnology*, 2000, 18: 615-622

- 11 - BERTONI et al. Restoration of dystrophin expression in *mdx* muscle cells by chimeraplast-mediated exon skipping, *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(10): 1087-1099
- 12 - BERTRAND L. Thérapie génique intracérébrale de la leucodystrophie métachromatique : étude préclinique chez le singe, *Thèse vétérinaire Nantes*, 2007, n°71, 72p.
- 13 - BIARD E., RIVIERE H. Principales maladies neuromusculaires, *Association Française contre les Myopathies: Vaincre les Myopathies*, 2003, 27
- 14 - BLOT S. Les myopathies des carnivores domestiques, *PMCAC*, 1995, 30 : 11-43
- 15 - BRAUND KG. Myopathies in dogs and cats, *Vet. Med.*, 1997, 7: 607-634
- 16 - BREEN M. et al. Chromosome specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes, *Genome Res*, 2001, 11: 1784-1795
- 17 - BROOKE MH. et al. Duchenne muscular dystrophy: Patterns of clinical progression and effects of supportive therapy, *Neurology*, 1989, 39: 475-481
- 18 - BROWN WF. et al. Neuromuscular function and disease: Basic, Clinical and Electrodiagnostic aspects, 2002, 1(3): 171
- 19 - BULFIELD G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 1984, 81(4): 1189-92
- 20 - BURGHEES AH. et al. A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene, *Nature*, 1987, 328(6129): 434-7
- 21 - CAI J. et al. Adenoviral gene transfer of HCN4 creates a genetic pacemaker in pigs with complete atrioventricular block, *Transplantation*, 2006, 81(7): 1022-1026
- 22 - CARGILL EJ. Et al. Heritability and segregation analysis of deafness in US Dalmatians, *Genetics*, 2004, 166: 1385-93

- 23 - CARPENTER JL. et al. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency, *American Journal of Pathology*, 1989, 135(5): 909-19
- 24 - CASAL M., HASKINS M. Large animal models and gene therapy, *European Journal of Human Genetics*, 2006, 14: 266-272
- 25 - CAVAZZANA-CALVO M et al. Gene therapy for human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Science*, 2000, 288(5466): 627-9
- 26 - CLUTTON-BROCK J. Origins of the dog: domestication and early history, *The domestic dog, its evolution, behaviour and interactions with people*, 1995, 27(6): 7-20
- 27 - COHEN-HAGUENAUER O. La thérapie génique, *Editions TEC and DOC*, 2001, 709p.
- 28 - COOPER BJ. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy, *Br. Med. Bull.*, 1989, 45: 703-718
- 29 - COOPER BJ. et al. Mosaic expression of dystrophin in carriers of canine X-linked muscular dystrophy, *Lab. Invest.*, 1990, 62(2): 171-178
- 30 - COOPER BJ. et al. X-linked muscular dystrophy in the dog, *Trends Genet.*, 1988, 4: 2
- 31 - COOPER BJ. et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dog, *Nature*, 1988, 334(6178): 154-156
- 32 - COPPINGER R. Dogs: a new understanding of canine origin, behaviour and evolution, *Chicago University Press*, 2001
- 33 - CORDAZZO C. Mise au point d'outils pour l'évaluation clinique de chiens atteints de myopathie dystrophique, *Thèse Méd. Vét.*, Alfort, 2007, n°14
- 34 - COX DR. et al. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes, *Science*, 1990, 250: 245-250

- 35 - CREPEL S. Le développement embryonnaire du chien : de la fécondation à la naissance, *Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie*, 1998, 33 : 25-30
- 36 - DAVIES KE., KHURANA TS. A new way to regulate the NMJ, *Nature Medicine*, 2007, 13(5): 538-539
- 37 - DEE UNGLAUB S. Physiologie humaine, 4^e Edition Paris, 2007, 936p.
- 38 - DE SAINT-BASILE G. Le syndrome de Wiskott-Aldrich, *Encyclopédie Orphanet*, 2003
- 39 - DEICHMANN A. et al. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy, *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117: 2225-2232
- 40 - DENTI MA. et al. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model, *Medical Sciences*, 2006, 103(10): 3758-3763
- 41 - DENTI MA. et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice, *Human Gene Therapy*, 2006, 17(5): 565-74
- 43 - FELSBURG et al. Overview of immune system development in the dog: comparison with humans, *Human Exp. Toxicology*, 2002, 21(9-10): 487-492
- 44 - GALIBERT F. Maladies génétiques du chien: informations et questions, www.ulg.ac.be/fmv/quant/chien.doc
- 45 - GALIBERT F. et al. Le chien, un modèle pour la génétique des mammifères, *Medecine Sciences*, 2004, 20 : 761-6
- 46 - GALIBERT F., ANDRE C. Le génome du chien: un modèle alternatif pour l'analyse fonctionnelle des gènes des mammifères, *Bull Acad Natl Med*, 2002, 186 : 1489-99

- 47 - GILBERT R. et al. Dystrophin expression in muscle following gene transfer with a fully deleted (« gutted ») adenovirus is markedly improved by trans-acting adenoviral gene products, *Human Gene Therapy*, 2001, 12(14): 1741-55
- 48 - GOYENVALLE A. et al. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping, *Science*, 2004, 306: 1796-1799
- 49 - GUO H. et al. Structure prediction of the RPE65 protein, *Journal of Theoretical Biology*, 2006, 242: 117-122
- 50 - GUYON R. et al. A 1 Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 5296-301
- 51 - HACEIN-BEY-ABINA S. et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1, *Science*, 2003, 302: 415-419
- 52 - HAMEL C., MARLHENS F. Des mutations de gènes contrôlant le métabolisme des rétinoïdes 11-cis responsables de dystrophies rétinienues sévères, *Medecine Sciences*, 1998, 14 : 754-7
- 53 - HANDSCHIN C. et al. PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and maeliorates Duchenne muscular dystrophy, *Genes and Development*, 2007, 21: 770-783
- 54 - HARE B. et al. The domestication of social cognition in dogs, *Science*, 2002, 298: 1634-1636
- 55 - HAUSER MA., CHAMBERLAIN JS. Progress towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy, *Journal of Endocrinology*, 1996, 149: 373-378
- 56 - HAUSER MA. et al. Improved Adenoviral vectors for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy, *Neuromuscular disorders*, 1997, 7: 277-283
- 57 - HEARD JM. et al. Réflexions sur l'avenir de la thérapie génique, *Médecine Sciences*, 2000, 16(12) : 1305-9

- 58 - HITTE C. et al. Facilitating Genome Navigation: Survey Sequencing and Dense Radiation Hybrid Gene Mapping, *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6: 643-8
- 59 - HOFFMAN EP. La myopathie de Duchenne, *Recherche*, 1993, 24(250) : 36-44
- 60 - HOWELL McC. et al. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials, *Neuromuscular disorders* 7, 1997: 325-328
- 61 - JACOBS JB. et al. Eye movement recordings as an effectiveness indicator of gene therapy in RPE65-deficient canines: implications for the ocular motor system, *Investigate ophthalmology and visual science*, 2006, 47(7): 2865-2875
- 62 - JIANG Z. et al. Traced orthologous amplified sequence tags and mammalian comparative maps, *Mamm Genome*, 1998, 9: 577-587
- 63 - JOUQUAND S. et al. Identification and characterization of a set of 100 tri- and dinucleotide microsatellites in the canine genome, *Anim Genet*, 2000, 31: 266-72
- 64 - KAPLAN JC., DELPECH M. Biologie moléculaire et médecine, *Seconde édition Flammarion*, 1996, 790p.
- 65 - KELLER E. Gene therapy for the dog, *Veterinary Cancer Society Newsletter*, 1994, 18(1): 10-11
- 66 - KERHOAS JM. Approche thérapeutique de la myopathie de Duchenne par la surexpression pharmacologique de l'utrophine chez le chien, *Thèse. Méd. Vét.*, Alfort 2003, n°58, 111p.
- 67 - KIRKNESS EF. et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis, *Science*, 2003, 301: 1898-903
- 68 - KLEOPA A. et al. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy, *Human Molecular Genetics*, 2006, 15(10): 1623-1628

- 69 - KORNEGAY JN. et al. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs, *Muscle nerves*, 1988, 11(10): 1056-1064
- 70 - LAUDUMIEY A. Les dystrophies musculaires de Duchenne et Becker: étude bibliographique et intérêt des trois modèles animaux (chien, chat et souris), *Thèse Méd. Vét.*, Alfort, 2004, n°70, 151p.
- 71 - LEDERBERG J., TATUM E. Reflections on Research and the Future of Medicine, *Columbia University*, 1966, 95, 1367-1379
- 72 - LE BEC C., DOUAR AM. Gene therapy Progress and Prospects – Vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors, *Gene Therapy*, 2006, 13: 805-813
- 73 - LEJEUNE S. Organisation du système immunitaire canin, *Thèse vétérinaire Lyon*, 2002, 84
- 74 - LIGHTFOOT RM. Retinal pigment epithelial dystrophy in Briard dog, *Research in Veterinary Science*, 1996, 60: 17-23
- 75 - LINDBLAD-TOH K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog, *Nature*, 2005, 438: 803-819
- 76 - LINGAAS F. et al. Towards construction of a canine linkage map: establishment of 16 linkage groups, *Mamm Genome*, 1997, 8: 218-21
- 77 - LORAIN S. et al. Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles, *Molecular Therapy*, 2008, 16(3): 541-7
- 78 - MAC CLOREY G. et al. Antisense oligonucleotides-induced exon skipping dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD, *Gene Therapy*, 2006, 13(19): 1373-81
- 79 - MEIER H. Myopathies in the dog, *Cornell Vet.*, 1958, 48: 313-330
- 80 - MELLERSH CS. et al. A linkage map of the canine genome, *Genomics*, 1997, 46: 326-36

- 81 - MIURA P., JASMIN B. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we ?, *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 12(3): 122 - 129
- 82 - NGUYEN F. La dystrophie musculaire du chien Golden Retriever: Etude histologique de la forme néonatale fulminante et contribution à l'étude de la pathogénie des lésions, *Thèse Méd. Vét.*, Nantes, 2001, n°008
- 83 - NARFSTROM K. Retinal dystrophy or 'congenital stationary night blindness' in the Briard dog, *Veterinary Ophtalmology*, 1999, 2: 75-76
- 84 - NARFSTROM K. et al. The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness, *British Journal of Ophtalmology*, 1989, 73: 750-756
- 85 - NARFSTROM K. et al. In vivo gene therapy in young and adult RPE65 -/- dogs produces long-term visual improvement, *Journal of Heredity*, 2003, 94(1): 31-37
- 86 - NARFSTROM K. et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog, *Investigate ophtalmology and visual Science*, 2003, 44(4): 1663-1672
- 87 - NONAKA I. Animal models of muscular dystrophies, *Laboratory Animal Science*, 1998, 48(1): 8-17
- 88 - O'BRIEN D. Neurological Examination and Development of the Neonatal Dog, *Seminars in Veterinary Medecine and Surgery*, 1994, 9(2) : 62-67
- 89 - OSTRANDER EA. et al. Canine genetics comes of age, *Trends Gene.*, 2000, 16: 117-23
- 90 - OSTRANDER EA., WAYNE RK. The canine genome, *Genome research*, 2005, 15: 1706-1716
- 91 - PANTHIER J.J. Et al. Génétique de la Souris, *Editions Belin Sup*, 2003, 283p.
- 92 - PARTRIDGE T. Animal models of muscular dystrophy. What can they teach us?, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1991, 17: 353-363

- 93 - PARTRIDGE T. Pathophysiology of muscular dystrophy, *Br. J. Hosp. Med.*, 1993, 49(1): 26-36
- 94 - PATTERSON DF. Companion Animal Medicine in the Age of Medical Genetics, *J. Vet. Intern. Med.*, 2000, 14: 1-9
- 95 - PAWLOWIEZ S. Contribution à l'étude clinique de la myopathie dystrophique du Golden Retriever, *Thèse Méd. Vét.*, Alfort, 2000, n°49, 119p.
- 96 - PEYRON C. et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains, *Nat Med*, 2000, 6: 991-7
- 97 - RANDO T. Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: Progress and challenges, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007: 262-271
- 98 - RANDO T. et al. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides, *Genetics*, 2000, 97(10): 5363-5368
- 99 - RANNOU B. Aspects génétiques de la dermatite atopique. Proposition du chien comme modèle d'étude, *Thèse Méd. Vét.*, Alfort, 2000, n°70, 97p.
- 100 - SADOULET-PUCCIO HM., KUNKEL LM. Dystrophin and its isoforms, *Brain Pathol.*, 1996, 6(1): 25-35
- 101 - SAMPAOLESI M. et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs, *Nature*, 2006, 444(30): 574-579
- 102 - SCHNACHNER T. et al. In vivo animal models of vein graft disease, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2006, 30: 451-463
- 103 - Site Association Française contre les Myopathies (AFM), <http://www.afm-France.org>, consulté le 13 octobre 2007

- 104 - Site Journal of Gene Medecine: www.wiley.co.uk/genmed/clinical
- 105 - Site NIH <http://www.genome.gov/11008069> et Site du Whitehead Institute http://www.broad.mit.edu/media/2003/pr_03_tasha.html
- 106 - Site OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals): <http://omia.angis.org.au/> (dernière mise à jour en novembre 2007)
- 107 - Site Retnet: "Gènes et locus impliqués dans les anomalies de la rétine": <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet>
- 108 - SKUK D. et al. First test of a « high-density injection » protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up, *Neuromuscular disorders*, 2007, 17: 38-46
- 109 - SLARP NJH. et al. An error in dystrophin mRNA processing in Golden Retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy, *Genomics*, 1992, 13(1): 115-121
- 110 - STREILEIN JW. et al. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants, *Vision Res*, 2002, 42: 487-495
- 111 - STRACHAN T., READ A.P. Génétique Moléculaire Humaine, *Editions Médecine-Sciences Flammarion*, 1998, 596 pages, 111p.
- 112 - SU-MIN G. et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset retinal dystrophy, *Nature Genetics*, octobre 1997, 17: 194-197
- 113 - SWITONSKI M. et al. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics, *Journal of applied genetics*, 2004, 45(2): 195-214
- 114 - THOMAS R. et al. An integrated cytogenetic, radiation-hybrid, and comparative map of dog chromosome 5, *Mamm Genome*, 2001, 12(5): 371-5

- 115 - VALENTINE BA. et al. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies, *J. Neurol. Sci.*, 1988, 88(1-3): 69-81
- 116 - VALENTINE BA. et al. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review, *Am. J. Med. Genet.*, 1992, 42: 352-356
- 117 - VAN DEUTEKOM J. et al. Local Dystrophin Restoration with Antisense Oligonucleotide PRO051, *The New England Journal of Medicine*, 2007, 357(26): 2677-2686
- 118 - VASSAIRE J.P. Le chien, animal de laboratoire, *Editions Vigot Frères*, 1972, 280p.
- 119 - VESKE A. et al. Retinal dystrophy of Swedish Briard/Briard-Beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65, *Genomics*, 1999, 57: 57-61
- 120 - VILA C. et al. Multiple and ancient origin of domestic dog, *Science*, 1997, 276: 1687-1689
- 121 - VOLAREVIAE S. et al. Manipulating Mammalian Genome by Gene Targeting, *Croate Medecine Journal*, 1999, 40(3): 368-374
- 122 - WANG Y. HSV-1 amplicon vectors are an efficient gene therapy system for skeletal muscle cells, *Curr. Gene Therapy*, 2006, 6(3): 371-81
- 123 - WANG Z. et al. Sustained AAV-mediated dystropin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression, *Mol. Ther.*, 2007, 15(6): 1160-6
- 124 - WAYNE R.K. et al. Lessons learned from the dog genome, *Trends in Genetics*, 2007, 23(11) : 557-567
- 125 - YOUNG et al. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical applications, *Journal of Pathologies*, 2006, 208 (2): 299-318

INTERÊT DU MODELE CANIN

EN THERAPIE GENIQUE

NOM et Prénom : VANBELLE Pauline

Résumé

La thérapie génique regroupe l'ensemble des technologies permettant le transfert d'ADN à visée thérapeutique dans un organisme vivant. Les avancées dans le domaine de la thérapie génique des cellules somatiques, porteuses de réelles promesses, s'appuient sur l'utilisation de modèles animaux. L'espèce canine s'est imposée grâce aux nombreuses similitudes qu'elle présente avec l'Homme, et offre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour de multiples maladies génétiques. Nous présenterons les grands principes de la thérapie génique ainsi qu'un état des lieux des essais cliniques chez l'Homme et le modèle canin. Deux illustrations rendront compte des atouts inégalés du Chien en thérapie génique : la myopathie de Duchenne chez le Golden Retriever et la dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien chez le Briard.

Mots clés MODELE ANIMAL – THERAPIE GENIQUE – TRANSFERT D'ADN – GENE – MALADIE GENETIQUE – DYSTROPHIE RETINIENNE – MYOPATHIE DE DUCHENNE – CARNIVORE – CHIEN – GOLDEN RETRIEVER – BERGER DE BRIE

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. ABITBOL Marie

Assesseur : Pr. BOSSE Philippe

Adresse de l'auteur : 3 rue Fermat – 14000 CAEN

INTEREST OF CANINE MODEL

FOR GENE THERAPY

SURNAME : VANBELLE

Given name : Pauline

Summary

Gene therapy contains all the technologies which allow DNA's transfert in a living organism with a therapeutic target. Advancement in somatic gene therapy, carrier of real promises, depend on the use of animal models. Canine species has grown on thanks to several similitudes with Man and offers new therapeutic outlooks for numerous genetic diseases. We'll introduce gene therapy principle and then we'll present trials on Man and on Canine model. Two illustrations will give an account of Dog unequaled assets in gene therapy: Duchenne muscular dystrophy in Golden Retriever, and retinal epithelial dystrophy in Briard dogs.

Keywords ANIMAL MODEL – GENE THERAPY – DNA TRANSFERT – GENE – GENETIC DISEASE – RETINAL DYSTROPHY – DUCHENNE MYOPATHY – CANINE RACE – CARNIVORE – DOG - GOLDEN RETRIEVER – BRIARD

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. ABITBOL Marie

Assessor : Pr. BOSSE Philippe

Author's address: 3 rue Fermat – 14000 CAEN - FRANCE

