

## COMMUNICATION

### **Vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes : application à la thérapie génique de la mucoviscidose**

MUCOVISCIDOSE. POUMON. THÉRAPIE GÉNÉTIQUE. VECTEURS SYNTHÉTIQUES.

#### *Non-viral gene carriers: contributions to cystic fibrosis gene therapy*

KEY-WORDS: CYSTIC FIBROSIS. LUNG. GENE THERAPY. SYNTHETIC VECTORS.

Pauline MAUGER \*,\*\*, Tony LE GALL \*, Tristan MONTIER \*,\*\*\*

#### RÉSUMÉ

*La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires dans les populations caucasiennes. Elle se transmet selon un mode autosomique récessif. Elle est causée par une ou plusieurs mutations dans le gène codant une protéine nommée Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR). Si son pronostic a été grandement amélioré grâce à un dépistage précoce et une meilleure prise en charge des symptômes cliniques, la mucoviscidose reste une maladie grave, souvent précocement mortelle, du fait de l'atteinte respiratoire. Les avancées récentes en matière pharmacologique ont permis d'améliorer la fonction pulmonaire et de normaliser le test de la sueur chez certains patients. Cependant, cette stratégie étant mutation dépendante, elle ne bénéficie pour l'instant qu'à une minorité de patients. Pour ce qui concerne la thérapie génique, un grand nombre de vecteurs non-viraux a été développé comme alternative aux virus recombinants. Si les vecteurs recombinants viraux sont particulièrement efficaces, ils peuvent induire une réponse immunitaire de l'hôte, compromettant le succès de nécessaires réadministrations. Parmi les 29 essais cliniques conduits dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose, une douzaine l'a été à l'aide de vecteurs synthétiques, essentiellement des lipides cationiques. Ceux-ci ont démontré une efficacité réelle — bien que modeste — avec une expression transitoire du transgène. Par ailleurs, ces formulations engendrent une faible toxicité et peu d'effets secondaires. Les recherches visent aujourd'hui à développer des formulations synthétiques plus efficaces, en poursuivant l'optimisation des vecteurs chimiques mais aussi celle des séquences d'acides nucléiques à délivrer.*

\* Unité INSERM 1078, équipe « Transfert de gènes et thérapie génique » ; Faculté de Médecine, Université de Bretagne Occidentale ; Université Bretagne Loire, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest

\*\* Service de Pédiatrie, CHRU de Brest, 5 Avenue du Maréchal Foch, 29609 Brest cedex.

\*\*\* Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU de Brest, 5 Avenue du Maréchal Foch, 29609 Brest cedex.

## SUMMARY

*Cystic Fibrosis (CF) is the most common of the hereditary genetic disorders among the Caucasian population. CF is an autosomal recessive disease that is due to mutations occurring in the gene encoding for the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR). Thanks to an early screening and a better care in therapies designed to address the symptoms of the disease, the prognostic has been strongly improved. However, CF remains a severe disease associated with premature death. Recent advances in the pharmacological field led to significant improvements in lung function and normalization of sweat chloride in some CF patients. Concerning gene therapy, numerous non-viral vectors have been developed as an alternative to recombinant viruses in order to avoid the problems of these latter, especially the immune response of the host. Among 29 CF gene therapy clinical trials, about one-third were conducted with synthetic vectors, essentially cationic lipids. These demonstrated a noticeable although still modest transfection efficacy with transient expression of the transgene. Furthermore, these formulations induced a low toxicity and only few side-effects contrary to viral vectors. Current researches aim to develop more efficient non-viral formulations through optimizations of the chemical vectors as well as that of the nucleic acid sequences to deliver.*

## Introduction

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas (Cystic Fibrosis en anglais, abrégé CF ci-après) est une maladie monogénique se transmettant selon un mode autosomique récessif. C'est la plus fréquente des maladies génétiques dans les populations caucasiennes, affectant 85 000 individus à travers le monde dont environ 6 200 en France [1]. Elle est causée par des mutations survenant dans le gène *cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). À ce jour, environ 2 000 mutations ont été répertoriées dans ce gène [2] ; elles sont classiquement regroupées en 6 classes selon les effets qu'elles engendrent sur l'expression et la fonction de la protéine CFTR (Tableau 1) [3].

Tableau 1. — Les classes de mutations du gène *cftr*.

Classe de mutations	Effet sur la protéine	Exemples de mutations
I	Défaut de production	G542X, W1282X, 1717-1G
II	Anomalie du trafic intracellulaire	$\Delta$ F508, N1303K, A561E
III	Défaut de régulation	G5551D, S549R, G1349D
IV	Altération de la fonction	R117H, R334W,
V	Réduction de la synthèse	A455E, 3272-26A>G
VI	Accélération du <i>turn-over</i>	c.120del23

Chez près de 70 % des patients, la principale mutation mise en évidence est une délétion de 3 paires de bases successives correspondant au codon de la phénylalanine située en position 508 de la protéine (mutation notée  $\Delta F508$ ). La protéine CFTR est un canal chlorure AMPc (Adénosine Mono-Phosphate cyclique) dépendant qui exerce parallèlement une fonction de régulation sur d'autres canaux ioniques comme les canaux ENaCs (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel). Son dysfonctionnement entraîne une déshydratation des surfaces épithéliales avec en particulier une augmentation de la viscosité du mucus. L'accumulation de ce dernier dans les voies respiratoires et digestives est à l'origine de syndromes obstructifs [6].

La mise en place du dépistage néonatal et l'amélioration des traitements symptomatiques ont permis d'augmenter significativement l'espérance de vie des patients ; aujourd'hui, elle est en moyenne de 35 ans. Toutefois, les traitements restent lourds et contraignants altérant considérablement la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de développer des traitements plus efficaces traitant non pas « uniquement » les causes mais l'origine même de la maladie c'est-à-dire l'atteinte génétique. Peu de temps après le clonage du gène *cftr* en 1989 [7], un traitement de cette maladie par thérapie génique a été envisagé grâce au développement de différentes méthodes permettant de véhiculer un transgène au sein de cellules eucaryotes.

Parallèlement, une connaissance plus approfondie de la protéine CFTR, de son fonctionnement, et de ses différents partenaires moléculaires a ouvert, la voie aux thérapies protéiques. Cette approche a permis de réelles avancées, lesquelles se sont concrétisées en 2012 par la mise sur le marché de l'Ivacaftor (Kalydeco<sup>®</sup>). Le médicament cible les mutations de classe III et IV (Tableau 1). Il permet d'obtenir à la fois une amélioration rapide et significative de la fonction pulmonaire, une prise de poids et une diminution du nombre d'exacerbations pulmonaires [8]. L'Orkambi<sup>®</sup>, associant l'Ivacaftor et le Lumacaftor, cible les mutations de classe II, ce qui rend les patients porteurs de la mutation  $\Delta F508$  éligibles à ce traitement. Chez ces derniers, l'Orkambi<sup>®</sup> contribue à une amélioration modeste de la fonction respiratoire tout en réduisant de manière significative le nombre d'exacerbations pulmonaires [9]. Toutefois, ces traitements étant par nature spécifiques de certaines mutations, ils bénéficient aujourd'hui à moins de 50 % des patients atteints de la mucoviscidose. Ils ne sont par ailleurs pas dépourvus d'effets secondaires.

Contrairement aux thérapies protéiques, la thérapie génique est indépendante du génotype du patient. Elle pourrait donc permettre de traiter l'ensemble des malades. Peu après le clonage du gène, des études menées *in vitro* sur des cellules épithéliales porteuses du gène *cftr* muté ont permis de rétablir l'expression de la protéine CFTR [10] et de démontrer l'intérêt d'une telle stratégie.

Si la mucoviscidose est une pathologie multiviscérale, les principaux signes cliniques concernent les appareils digestifs et respiratoires. La diminution des capacités respiratoires est aujourd'hui dans les pays développés, la cause majeure de mortalité

et de morbidité des patients atteints, ce qui fait des poumons le principal organe cible pour le transfert de gènes.

## **PRINCIPES DU TRANSFERT DE GÈNES**

La thérapie génique peut se définir comme le transfert d'une construction d'acides nucléiques au moyen d'un vecteur dans des cellules cibles d'un patient à des fins thérapeutiques. Comme évoqué précédemment, c'est essentiellement l'atteinte respiratoire des patients qui aujourd'hui engage leur pronostic vital. L'objectif est donc de délivrer au sein des cellules de l'épithélium respiratoire un gène *cftr* fonctionnel (appelé aussi transgène) qui compense celui défectueux à l'origine de la maladie.

Il s'agit d'une thérapie génique somatique c'est-à-dire sans transmission à la descendance. Contrairement à d'autres tissus comme le tissu hématopoïétique, il semble difficilement envisageable, dans le cas de la mucoviscidose, d'employer une stratégie *ex vivo* impliquant de prélever des cellules issues du tissu cible, de les modifier et de les sélectionner *in vitro* avant de les réimplanter chez le patient. Il s'agit donc d'une approche *in vivo* où le gène *cftr* doit être délivré *in situ*. Ainsi, le mode d'administration le plus adapté est donc la nébulisation ou aérosolisation par les voies aériennes supérieures.

Par ailleurs, il est important de prendre en compte la durée d'expression du transgène. Celle-ci dépend à la fois de la stabilité de ce dernier mais aussi de la durée de vie des cellules traitées. L'épithélium respiratoire se renouvelant environ tous les 40 jours, des ré-administrations doivent donc être effectuées, à moins de réussir à toucher les cellules souches.

L'ADN, polymère anionique hydrophile, est incapable de franchir seul les membranes biologiques de l'épithélium pulmonaire. Ce processus de transfert nécessite donc un vecteur permettant de compacter et de délivrer le gène d'intérêt dans les cellules cibles. Les vecteurs viraux recombinants et les vecteurs synthétiques ont été utilisés comme agents de transfert de gènes notamment dans le cadre d'essais cliniques de thérapie génique appliquée à la mucoviscidose.

## **LES VECTEURS UTILISÉS**

### **Les vecteurs viraux**

Ce type de vecteurs correspond à des virus recombinants dépourvus des gènes de virulence codant certaines protéines indispensables au cycle infectieux. Très schématiquement, ces gènes sont remplacés par la séquence du gène d'intérêt et sont produits par des cellules d'encapsidation. Le tout premier essai clinique appliqué à la mucoviscidose avec ce type de vecteur a eu lieu en 1993 au moyen d'un adénovirus.

Par la suite, 17 autres essais cliniques ont été menés utilisant des adénovirus (AdV), des adéno-associated virus (AAV) ou des virus à ARN [5]. Ces études ont mis en évidence des réactions inflammatoires et immunitaires importantes rendant difficiles voire impossibles toutes ré-administrations pourtant indispensables compte tenu de la chronicité de la maladie. Depuis, des vecteurs lentiviraux ont été développés mais ils n'ont pas encore été évalués chez des patients atteints de mucoviscidose. Les études précliniques utilisant ces derniers ont livré des résultats encourageants. En effet, Griesenbach et coll. ont montré qu'un vecteur lentiviral pseudotypé avec une protéine d'enveloppe comme l'héماغlutinine influenza (HA) ou la glycoprotéine gp 64 du baculovirus transfectait de façon efficace les cellules épithéliales des voies respiratoires et que l'expression du gène était maintenue chez la souris. De plus, ce vecteur pouvait être administré de façon répétée sans perte d'efficacité, ce dernier n'entraînant pas de réponse immunitaire [11, 12]. Le consortium britannique de thérapie génique travaille actuellement au premier essai clinique de thérapie génique (phase I) afin d'évaluer ce type de vecteur viral chez des patients atteints de mucoviscidose.

Même si des progrès importants ont été obtenus avec les vecteurs viraux de dernière génération, la production et la manipulation de tels vecteurs restent compliquées et coûteuses, ce qui justifie pleinement la poursuite des recherches consistant à développer des vecteurs synthétiques.

### **Les vecteurs non viraux**

Les polymères et lipides cationiques sont capables de s'associer par interactions électrostatiques avec le polymère anionique qu'est l'ADN. Les auto-assemblages vecteur/ADN qui en résultent sont des complexes nanométriques (appelés polyplexes ou lipoplexes) pouvant être internalisés par les cellules. L'ADN, en général un plasmide comportant une cassette d'expression eucaryote du transgène, doit ensuite être libéré de son vecteur, sortir de l'endosome et gagner le cytoplasme puis le noyau afin d'y être transcrit [13]. Un grand nombre de molécules a été synthétisé que ce soit des lipides cationiques ou des polymères cationiques. Si beaucoup de ces vecteurs démontrent une relativement bonne efficacité *in vitro*, un nombre beaucoup plus limité de molécules a fait la preuve de son efficacité *in vivo*, notamment dans des conditions compatibles avec un usage clinique (cf § précliniques et essais cliniques).

### **Les polymères cationiques**

Comme leur nom l'indique, il s'agit de molécules constituées d'un motif chimique se répétant *n* fois et portant des multiples charges positives leur permettant de condenser des acides nucléiques. Les premiers polymères cationiques utilisés dès 1987 pour le transfert de gènes ont été successivement le diéthylaminoéthyl-dextran (DEAE-dextran), la Poly-L-Lysine (PLL) puis les polyéthylènimines (PEI) [14]. Plus récemment se sont développés des systèmes tels que les méthacrylates (1996) et le chitosan (1998) [15]. Les PEIs, sous formes linéaires (L-) ou branchées (B-) ont été

les plus employées comme vecteurs pour le transfert de gènes vers l'épithélium pulmonaire.

La PEI incorpore une amine tous les trois atomes (Figure 1) ce qui lui confère une densité de charges positives extrêmement élevée. De plus, étant donné que seules environ 20 % des fonctions amines de la PEI sont protonées au pH physiologique, les amines non protonées confèrent un pouvoir tampon dit « d'éponge à protons », bénéfique durant le trafic intracellulaire des polyplexes. Depuis sa première utilisation en 1990, une multitude de variations chimiques a été apportées à la PEI afin d'accroître son efficacité, diminuer sa toxicité, ou encore permettre un ciblage cellulaire [16].

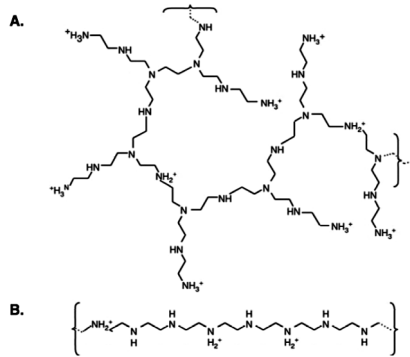


FIG. 1. — Structures chimiques de la PEI sous forme branchée (b-PEI) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) (A) et sous forme linéaire (l-PEI) (Jet PEI<sup>®</sup>) (B)

### Les lipides cationiques

Le premier lipide cationique a été synthétisé par le Pr Felgner et son équipe en 1987. Il s'agissait du DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-diolexy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium). Le terme de « lipofection » a alors été introduit pour désigner la transfection au moyen de lipides cationiques. À cette même période, le Pr. Behr et son équipe mirent au point une lipopolyamine, appelée DOGS (dioctadécylamine-glycine-spermine). Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés, dont certains sont commercialisés pour des applications en biologie moléculaire.

Les lipides cationiques ont généralement une même organisation structurale. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile, d'un bras espaceur et d'un domaine hydrophobe. Ces domaines ont chacun un rôle particulier de par leurs propriétés physicochimiques. Schématiquement, la tête polaire hydrophile permet l'interaction électrostatique avec l'ADN. La taille et la nature du bras espaceur influencent la

stabilité et la biodégradabilité du vecteur. Enfin, le domaine hydrophobe est impliqué dans l'assemblage supramoléculaire et influence les interactions avec les membranes biologiques. Les modifications de l'un ou l'autre de ces domaines entraînent des modifications aboutissant à des composés ayant des propriétés différentes et impactant leur efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo*.

Les lipides cationiques peuvent être classés selon leur nombre de charges ou la nature de leur pôle hydrophobe. La figure 3 présente quelques exemples de lipides cationiques dont certains ont été utilisés dans des essais cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose.

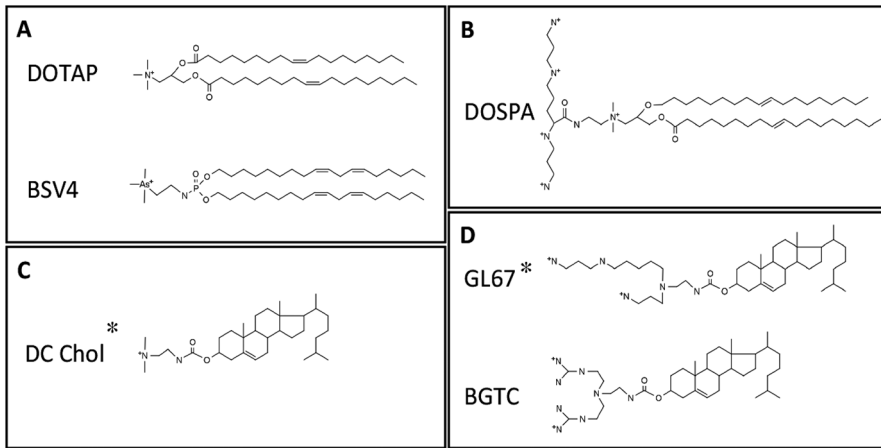


FIG. 2. — Exemples de lipides cationiques.

- A) Lipides monocationiques composés de 2 chaînes aliphatiques.  
**DOTAP** : méthylsulfate de *N*-[1-(2,3 dioléoyloxy) propyl](*N,N,N*- triméthylammonium) [17].  
**BSV4** : Brest Synthetic Vector 4 [18].
- B) Lipide polycationique composé de chaînes aliphatiques.  
**DOSPA** : 2,3-dioléoyloxy-*N*-[2- (spermine-carboxamido)éthyl]-*N,N*-diméthyl-1-propanammonium trifluoroacétate [19].
- C) Lipide monocationique dérivés du cholestérol.  
**DC Chol** : 3-β-*N*-(*N'*, *N'*diméthylaminoéthane)- carbamoyl]-cholestérol [20].
- D) Lipides polycationiques dérivés du cholestérol.  
**GL67** : *N*4-spermine cholesterylcarbamate ; (genzyme corporation).  
**BGTC** : bis(guanidinium)-tren-cholestérol [21]

\* vecteurs utilisés dans des essais cliniques de thérapie génique appliqués à la mucoviscidose.

La moindre efficacité des vecteurs synthétiques par rapport aux vecteurs viraux est probablement liée au mécanisme de sortie de l'endosome puisqu'il a été observé que seule une infime fraction des séquences d'acides nucléiques administrées parvient à gagner ensuite le cytosol [22]. Pour favoriser l'échappement endosomal des lipo-

plexes, des stratégies ont été développées dont la plus commune est l'ajout d'un co-lipide neutre, comme par exemple la DiOleoylPhosphatidylEthanolamine (DOPE), au lipide cationique permettant la formation de phases hexagonales inverses favorisant la fusion du complexe avec la membrane de la vésicule endosomale. L'élaboration de lipides adoptant naturellement ce type de structure fusogène a également été proposée [18, 23, 24].

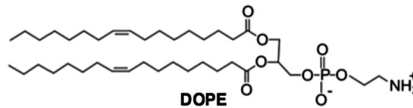


FIG. 3. — Structure chimique de la DOPE

Le but est donc d'associer judicieusement ces composés aux propriétés complémentaires afin d'obtenir des formulations innovantes capables de franchir les barrières extra- et intracellulaires pour un transfert de gènes, à la fois efficace et sûr au sein des cellules de l'épithélium respiratoire.

## BARRIÈRES BIOLOGIQUES AU TRANSFERT DE GÈNES

De nombreuses barrières physiologiques s'opposent à la délivrance et l'expression d'un gène d'intérêt au sein de l'organisme, en l'occurrence ici les poumons dans le cas de la mucoviscidose. Elles se situent à la fois à l'extérieur de la cellule puis à l'intérieur de celle-ci.

À l'intérieur des voies respiratoires, les complexes peuvent être piégés par la couche de mucus qui les tapisse et ils peuvent ainsi être éliminés par le mécanisme de clairance muco-ciliaire [25, 26]. Si le complexe n'est pas éliminé, il doit pénétrer un mucus plus ou moins visqueux, traverser le liquide péri-ciliaire sans être reconnu par les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes...), atteindre la surface cellulaire, et franchir la membrane plasmique. Dans le contexte de la mucoviscidose, cette barrière est d'autant plus compliquée à franchir du fait de l'inflammation chronique, de l'excès de mucus, ainsi que de sécrétions purulentes contenant des débris cellulaires et bactériens (notamment de l'ADN et de l'actine). Ces conditions peuvent altérer l'intégrité des vecteurs et limiter leur trafic vers les membranes cellulaires. Étant donné que les jonctions serrées empêchent tout accès à la partie basale des cellules, seule la partie apicale des cellules comprenant les cils vibratiles est en principe accessible aux agents de transfert de gènes [27].



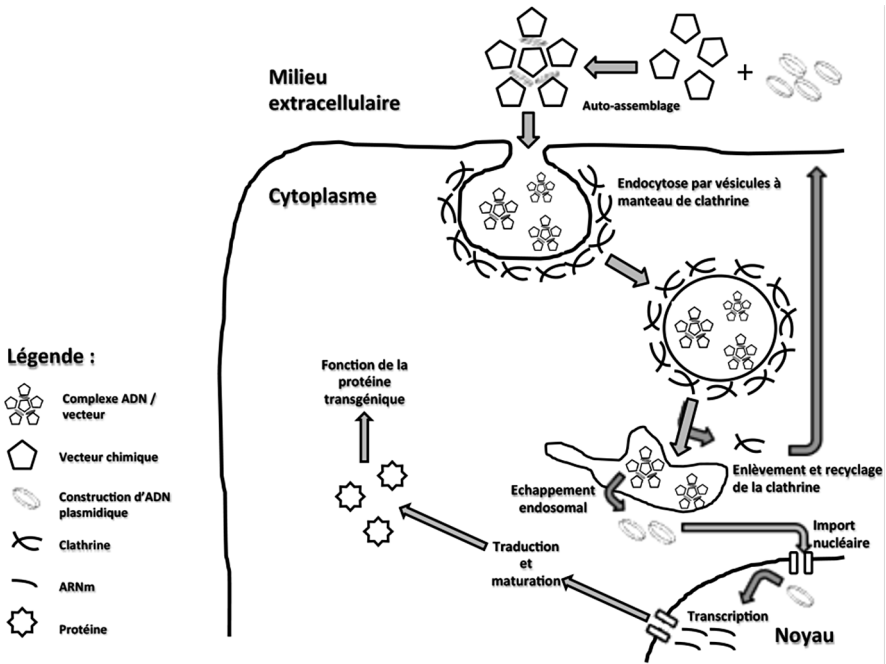


FIG. 4. — Étapes successives du transfert de gènes et barrières s’y opposant. Avant de pouvoir être exprimé dans le noyau, l’ADN doit franchir plusieurs barrières. Dans le milieu extra-cellulaire, l’ADN plasmidique doit être complexé par un vecteur afin de ne pas être perdu ou dégradé. Les complexes doivent ensuite interagir avec la membrane plasmique afin de pouvoir être internalisés dans la cellule. L’endocytose des complexes se fait classiquement par la voie clathrine-dépendante. L’échappement endosomal de l’ADN est un préalable important afin d’éviter la dégradation et pour accéder au cytoplasme. La migration vers le noyau doit ensuite se faire en évitant la dégradation par les DNases cytoplasmiques. L’ADN peut pénétrer dans le noyau lorsque la membrane nucléaire disparaît durant la mitose ou il peut être transporté de façon active au travers des pores nucléaires. L’ADN peut alors être pris en charge par la machinerie de transcription au sein du noyau puis l’ARNm synthétisé à partir du transgène peut être traduit dans le cytoplasme générant ainsi une protéine fonctionnelle.

Par la suite, ce complexe doit franchir les étapes décrites dans la figure 4. Les vecteurs doivent alors satisfaire à un paradoxe : si le complexe ADN/vecteur doit demeurer stable à l’extérieur de la cellule jusqu’au franchissement de la membrane plasmique, il doit en revanche être instable une fois à l’intérieur de la cellule dans le cytoplasme. En effet, la dissociation ADN/vecteur et la translocation nucléaire de l’ADN à proximité du noyau doivent s’effectuer avant d’accéder à la machinerie de transcription.

Ainsi, les attributions d'un vecteur de transfert de gènes sont multiples, incluant tout d'abord un rôle de protection et de compaction de l'ADN afin de lui permettre de franchir différentes étapes successives que sont : (1) le trafic extracellulaire, (2) l'entrée dans la cellule, (3) la libération de l'ADN à proximité du noyau cellulaire, (4) l'entrée de l'ADN dans le noyau, et (5) l'expression du transgène (Figure 4) [28, 29].

Grâce à une meilleure connaissance des barrières extra- et intracellulaires décrites, l'efficacité et le ciblage des nanovecteurs ont été progressivement améliorés. Un enjeu important reste ensuite de pouvoir évaluer un maximum de ces formulations dans les conditions les plus proches de la clinique. À cette fin, le mode d'administration et le modèle animal choisi sont déterminants.

### **Études pré-cliniques utilisant des vecteurs synthétiques**

Dans les essais pré-cliniques *in vitro* et *in vivo*, les vecteurs non viraux sont généralement moins efficaces que les vecteurs viraux [30]. Toutefois, il faut noter qu'à ce jour aucune comparaison directe n'a encore été réalisée.

Concernant la PEI branchée (25 kDa), des études ont montré une expression du gène rapporteur détectée dans les cellules épithéliales de l'ensemble du tractus respiratoire murin [31, 32] et ovin [33]. De plus, avec ce même polymère, il a pu être observé que les complexes résistaient de façon efficace au processus de nébulisation [34, 35]. En revanche, l'instillation de complexes formés de PEI linéaire (22 kDa), bien que permettant d'obtenir une expression pulmonaire transitoire du transgène chez le rat, était accompagnée d'une inflammation sévère dès le lendemain de l'administration [36].

Pour ce concerne les lipides cationiques, des études précliniques *in vitro* et *in vivo* (sur modèle souris et brebis) ont permis de montrer que la formulation GL67/DOPE/DMPE-PEG (= GL67A, Genzyme®) était la plus efficace parmi les vecteurs non-viraux actuellement disponibles [26, 33, 37]. Différentes équipes telles que la nôtre travaillent à l'élaboration et à l'optimisation de ce type de vecteurs en vue d'augmenter leur efficacité tout en préservant leur innocuité [18, 23, 24]. Par ailleurs, les vecteurs que nous développons ont pour certains également démontrés une activité bactéricide *in vitro*, ce qui pourrait être un atout déterminant compte tenu des infections pulmonaires chroniques dont souffrent également les patients atteints de mucoviscidose [24].

### **ESSAIS CLINIQUES UTILISANT DES VECTEURS NON VIRALX**

À ce jour, 12 essais cliniques de phases I à IIb utilisant des vecteurs synthétiques ont été menés chez des patients atteints de mucoviscidose. Un essai clinique a utilisé un polymère cationique. Cet essai mené par Konstan et *coll.* sur 12 patients avec la

Poly-L-Lysine courte n'a rapporté qu'une correction partielle du transport des ions chlorures avec un maintien de cette activité jusqu'à 6 jours au maximum [38].

Tous les autres essais ont consisté à évaluer un lipide cationique (DC-Chol, DOTAP, DMRIE, GL67A...). Dans la plupart de ces essais, la mesure de la DDP (Différence De Potentiel) trans-épithéliale a permis de montrer une correction partielle et transitoire du transport d'ions chlorures au niveau nasal. Dès 1995, l'étude de Caplen et coll. a clairement démontré la fonctionnalité de la protéine CFTR produite par le transgène dans les cellules nasales. Puis, suite aux études précliniques ayant montré que le GL67A était le vecteur synthétique le plus efficace, Alton et son équipe ont mené un essai clinique de phase II ayant permis de démontrer l'expression de la protéine CFTR au niveau des voies aériennes supérieures et inférieures. Un effet bénéfique sur la DDP nasale de même que sur la fonction canal chlore avaient été mesurés, avec une normalisation prolongée chez 2 patients [39]. En revanche, une réponse inflammatoire était observée et l'expression du transgène était transitoire après un aérosol unique de GL67A/pCFTR. Ces constatations ont donc conduit ces auteurs à développer une nouvelle génération de plasmides dits « CpG free ». Comparativement aux plasmides utilisés auparavant, ces plasmides dépourvus d'ilôts CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) n'induisaient pas ou peu d'inflammation et ils permettaient de maintenir une expression du transgène à un niveau suffisamment élevé pour obtenir un effet thérapeutique sur un temps prolongé [40]. L'essai clinique de phase I/IIa simple dose mené par la même équipe utilisant ce type de plasmide comportant une cassette *cftr* (pGM169) associé à la formulation GL67A a permis de sélectionner les doses les plus appropriées et d'évaluer la tolérance de ces vecteurs. Ainsi, de 2012 à 2014, 136 patients de plus de 12 ans ont été inclus dans un essai clinique de phase IIb multicentrique randomisé, en double aveugle, comparant le traitement par thérapie génique au placebo. La moitié des patients recevait la thérapie génique par nébulisation (solution de 5 mL contenant 13,5 mg de plasmide pGM169 complexé à 75 mg de GL67A) et l'autre, un traitement placebo (nébulisation de sérum salé), à raison d'une fois par mois pendant 1 an. À l'issue de cet essai, les patients du groupe traités par thérapie génétique présentaient une amélioration de 3,7 % de leur VEMS (Volume Expiratoire Maximum Seconde) par rapport à ceux ayant reçu le placebo. L'amélioration atteignait 6,4 % chez les patients ayant la fonction respiratoire la plus dégradée (VEMS < 70 %). Cette augmentation significative quoique modeste indiquait une stabilisation de la fonction pulmonaire.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cet essai clinique de phase IIb mené par le consortium britannique a établi une preuve de faisabilité et de concept dans le développement d'une thérapie génique non-virale destinée à tous les patients, indépendamment du type de mutation dont ils sont porteurs. Ces résultats sont encourageants et plein d'espoirs pour les

malades. Ils ouvrent la voie pour de futures études de phase III sur un nombre plus important de patients. Si de nombreux progrès continuent d'être réalisés pour améliorer et optimiser les vecteurs synthétiques, de récentes avancées ont aussi vu le jour concernant l'optimisation de la structure d'ADN. En particulier, l'édition du génome est un domaine en plein essor laissant entrevoir la possibilité de corriger le gène muté au sein même des cellules cibles à traiter. La versatilité des vecteurs synthétiques développés pourraient permettre de les utiliser pour véhiculer ces outils jusque dans les cellules épithéliales afin de corriger le gène *cftr in situ*. Loin de s'opposer, les différentes stratégies actuellement explorées pourraient être tout à fait complémentaires et bénéficier ensemble aux patients. Ainsi, un traitement futur de la mucoviscidose pourrait consister en la combinaison de plusieurs thérapies, celle ciblant le gène avec celle ciblant la protéine.

## RÉFÉRENCES

- [1] couv registre\_2014 3.indd — rapport\_registre\_2014.pdf [Internet]. [cité 13 sept 2016]. Disponible sur: [http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport\\_registre\\_2014.pdf](http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport_registre_2014.pdf)
- [2] Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics [Internet]. [cité 30 août 2016]. Disponible sur: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
- [3] Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. N Engl J Med. 12 mai 2005;352(19):1992-2001.
- [4] Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. J Intern Med. févr 2015;277(2):155-66.
- [5] Griesenbach U, Pytel KM, Alton EFWF. Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. Hum Gene Ther. 1 mai 2015;26(5):266-75.
- [6] Donaldson SH, Boucher RC. Physiopathologie de la mucoviscidose. Ann Nestlé Ed Fr. 2006;64(3):101-9.
- [7] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 8 sept 1989;245(4922):1066-73.
- [8] McKone EF, Borowitz D, Drevinek P, Griese M, Konstan MW, Wainwright C, et al. Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST). Lancet Respir Med. nov 2014; 2(11):902-10.
- [9] Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. N Engl J Med. 16 juill 2015;373(3):220-31.
- [10] Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, et al. Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediated gene transfer. Cell. 21 sept 1990;62(6):1227-33.
- [11] Mitomo K, Griesenbach U, Inoue M, Somerton L, Meng C, Akiba E, et al. Toward Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using a Lentivirus Pseudotyped With Sendai Virus Envelopes. Mol Ther. juin 2010;18(6):1173-82.
- [12] Griesenbach U, Inoue M, Meng C, Farley R, Chan M, Newman NK, et al. Assessment of F/HN-Pseudotyped Lentivirus as a Clinically Relevant Vector for Lung Gene Therapy. Am J Respir Crit Care Med. 1 nov 2012;186(9):846-56.

- [13] Pichon C, Billiet L, Midoux P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr Opin Biotechnol.* oct 2010;21(5):640-5.
- [14] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 août 1995;92(16):7297-301.
- [15] Godbey WT, Mikos AG. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 14 mai 2001;72(1-3):115-25.
- [16] Neu M, Fischer D, Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med.* août 2005;7(8):992-1009.
- [17] Stamatatos L, Leventis R, Zuckermann MJ, Silviu JR. Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry (Mosc).* 31 mai 1988;27(11):3917-25.
- [18] Le Gall T, Loizeau D, Picquet E, Carmoy N, Yaouanc J-J, Burel-Deschamps L, *et al.* A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities. *J Med Chem.* 25 févr 2010;53(4):1496-508.
- [19] Schwarz LA, Johnson JL, Black M, Cheng SH, Hogan ME, Waldrep JC. Delivery of DNA-cationic liposome complexes by small-particle aerosol. *Hum Gene Ther.* 10 avr 1996;7(6):731-41.
- [20] Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 août 1991;179(1):280-5.
- [21] Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley JC, Basseville M, *et al.* Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 sept 1996;93(18):9682-6.
- [22] Lechardeur D, Lukacs GL. Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous.
- [23] Le Gall T, Barbeau J, Barrier S, Berchel M, Lemiègre L, JeftiJ, *et al.* Effects of a novel archaeal tetraether-based colipid on the *in vivo* gene transfer activity of two cationic amphiphiles. *Mol Pharm.* 2 sept 2014;11(9):2973-88.
- [24] Le Gall T, Berchel M, Le Hir S, Fraix A, Salaün JY, Férec C, *et al.* Arsonium-containing lipophosphoramidates, poly-functional nano-carriers for simultaneous antibacterial action and eukaryotic cell transfection. *Adv Healthc Mater.* nov 2013;2(11):1513-24.
- [25] Boucher RC. Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol.* 1 mai 1999;516(Pt 3):631-8.
- [26] Pringle IA, Raman S, Sharp WW, Cheng SH, Hyde SC, Gill DR. Detection of plasmid DNA vectors following gene transfer to the murine airways. *Gene Ther.* 31 mars 2005; 12(15):1206-14.
- [27] Ferrari S, Geddes DM, Alton EFWF. Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 5 déc 2002;54(11):1373-93.
- [28] Montier T, Delépine P, Pichon C, Férec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* nov 2004;22(11):586-92.
- [29] Montier T, Benvegna T, Jaffrès P-A, Yaouanc J-J, Lehn P. Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr Gene Ther.* oct 2008; 8(5):296-312.
- [30] Griesenbach U, Alton EFWF. Moving forward: cystic fibrosis gene therapy. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2013;22(R1):R52-8.
- [31] Gautam A, Densmore CL, Golunski E, Xu B, Waldrep JC. Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* avr 2001;3(4):551-6.

- [32] Davies LA, Hyde SC, Nunez-Alonso G, Bazzani RP, Harding-Smith R, Pringle IA, et al. The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. *Biomaterials*. août 2012;33(22):5618-27.
- [33] McLachlan G, Davidson H, Holder E, Davies LA, Pringle IA, Sumner-Jones SG, et al. Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. *Gene Ther*. 2011;18(10):996-1005.
- [34] Densmore CL, Orson FM, Xu B, Kinsey BM, Waldrep JC, Hua P, et al. Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. févr 2000;1(2):180-8.
- [35] Rudolph C, Müller RH, Rosenecker J. Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and *in vitro* gene delivery efficiency. *J Gene Med*. févr 2002;4(1):66-74.
- [36] Uduehi AN, Stammberger U, Kubisa B, Gugger M, Buehler TA, Schmid RA. Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine/DNA on lung function after airway instillation to rat lungs. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. juill 2001;4(1):52-7.
- [37] Alton EFWF, Baker A, Baker E, Boyd AC, Cheng SH, Coles RL, et al. The safety profile of a cationic lipid-mediated cystic fibrosis gene transfer agent following repeated monthly aerosol administration to sheep. *Biomaterials*. déc 2013;34(38):10267-77.
- [38] Konstan MW, Davis PB, Wagener JS, Hilliard KA, Stern RC, Milgram LJH, et al. Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum Gene Ther*. déc 2004;15(12):1255-69.
- [39] Alton EW, Stern M, Farley R, Jaffe A, Chadwick SL, Phillips J, et al. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 20 mars 1999;353(9157):947-54.
- [40] Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, Varathalingam A, et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol*. 27 avr 2008;26(5):549-51.