



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



Année: 2022

Thèse N°: 09

THERAPIE GENIQUE ET CRISPR-CAS 9

THESE

Présentée et soutenue publiquement le : / /2022

PAR

Madame Fatima Zahra EL HACHIMI

Née le 04 Février 1998 à Casablanca

Pour l'Obtention du Diplôme de

Docteur en Pharmacie

Mots Clés : Thérapie génique; CRISPR-cas9; Génome; ADN

Membres du Jury :

Monsieur Jaouad EL HARTI

Professeur de Chimie Thérapeutique

Monsieur Azeddine IBRAHIMI

Professeur de Biologie Moléculaire

Madame Mouna OUADGHIRI

Professeur de Microbiologie

Madame Naima EL HAFIDI

Professeur de Pédiatrie

Président

Rapporteur

Juge

Juge

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قالوا سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



**UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIERABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 - 1969: Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 - 1974: Professeur Abdellatif BERBICH
1974 - 1981: Professeur Bachir LAZRAK
1981 - 1989: Professeur Taieb CHKILI
1989 - 1997: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 - 2003: Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 - 2013: Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen :

Professeur Mohamed ADNAOUI

Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes

Professeur Brahim LEKEHAL

Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération

Professeur Taoufiq DAKKA

Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie

Professeur Younes RAHALI

Secrétaire Général

Mr. Mohamed KARRA

****Enseignant militaire***

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne - [Clinique Royale](#)
Anesthésie -Réanimation
Pathologie Chirurgicale

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne – [Doyen de la FMPR](#)
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. TAZI Saoud Anas

Gynécologie -Obstétrique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENSOUA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZAD Rachid
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique Méd. [Chef Maternité des Orangers](#)
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie- [Dir. du Centre National PV Rabat](#)
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUA Adil
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale [Doyen de FMPT](#)
Anesthésie Réanimation
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Anatomie
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques [Doyen de la FMPE](#)
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale – [Directeur du CHIS](#)
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Chirurgie Générale
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

**Enseignant militaire*

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie [Inspecteur du SSM](#)
Pédiatrie
Traumatologie – Orthopédie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. EL MESNAOUI Abbas
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOVAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Néphrologie
Cardiologie [Directeur HMI Mohammed V](#)

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BIROUK Nazha
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Neurologie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie [Directeur Hôp.Ar-razi Salé](#)
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Neurologie Doyen de la FMP Abulcassis
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUAMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

****Enseignant militaire***

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie - [Directeur Hôp. Cheikh Zaid](#)
Urologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJILIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie - [Pédiatrique Directeur Hôp. Des Enfants Rabat](#)
Chirurgie Générale
Pédiatrie - [Directeur Hôp. Univ. International \(Cheikh Khalifa\)](#)
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale [Directeur Hôpital Ibn Sina](#)
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique [V-D chargé Aff Acad. Est.](#)
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair
Pr. FILALI ADIB Abdelhai

Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Gynécologie Obstétrique

****Enseignant militaire***

Pr. HAJJI Zakia
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RAISS Mohamed
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Ophtalmologie
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre *
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif*
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Rhumatologie
Ophtalmologie
Rhumatologie [Directeur Hôp. Al Avachi Salé](#)
Pédiatrie
Cardiologie
Biophysique
Cardiologie (mise en disponibilité)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal

Rhumatologie
Hématologie
O.R.L
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire. [Directeur Hôpital Ibn Sina Marr.](#)
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie

****Enseignant militaire***

Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. AMHAJJI Larbi *
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed *
Pr. BALOUCH Lhousaine *
Pr. BENZIANE Hamid *
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHERKAOUI Naoual *
Pr. EL BEKKALI Youssef *
Pr. EL ABSI Mohamed
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GHARIB Nouredine
Pr. HADADI Khalid *
Pr. ICHOU Mohamed *
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LOUZI Lhoussain *
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. OUZZIF Ez zohra *
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine *
Pr. SIFAT Hassan *
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour *
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie cardio-vasculaire
Chirurgie générale
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Microbiologie
Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Hématologie biologique
Biochimie-chimie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie-orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali *
Pr. AGADR Aomar *
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
Pr. AKHADDAR Ali *

Médecine interne
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Neuro-chirurgie

****Enseignant militaire***

Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADÉ Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie [Directeur Hôp.des Spécialités](#)
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie-orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-Phtisiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
 Médecine Interne [Directeur ERSSM](#)
 Physiologie
 Microbiologie
 Médecine Aéronautique
 Biochimie- Chimie
 Radiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Plastique et Réparatrice
 Urologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

Decembre 2010

Pr.ZNATI Kaoutar

Anatomie Pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
 Pr. ABOUELALAA Khalil *
 Pr. BENCHEBBA Driss *

Chirurgie pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Traumatologie-orthopédie

****Enseignant militaire***

Pr. DRISSI Mohamed *
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL OUAZZANI Hanane *
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique

Février 2013

Pr.AHID Samir
Pr.AIT EL CADI Mina
Pr.AMRANI HANCHI Laila
Pr.AMOR Mourad
Pr.AWAB Almahdi
Pr.BELAYACHI Jihane
Pr.BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr.BENCHEKROUN Laila
Pr.BENKIRANE Souad
Pr.BENSGHIR Mustapha *
Pr.BENYAHIA Mohammed *
Pr.BOUATIA Mustapha
Pr.BOUABID Ahmed Salim*
Pr BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr.CHAIB Ali *
Pr.DENDANE Tarek
Pr.DINI Nouzha *
Pr.ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr.ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr.ELFATEMI NIZARE
Pr.EL GUERROUJ Hasnae
Pr.EL HARTI Jaouad
Pr.EL JAOUDI Rachid *
Pr.EL KABABRI Maria
Pr.EL KHANNOUSSI Basma
Pr.EL KHLOUFI Samir
Pr.EL KORAICHI Alae
Pr.EN-NOUALI Hassane *
Pr.ERRGUIG Laila
Pr.FIKRI Meryem
Pr.GHFIR Imade
Pr.IMANE Zineb
Pr.IRAQI Hind
Pr.KABBAJ Hakima
Pr.KADIRI Mohamed *
Pr.LATIB Rachida
Pr.MAAMAR Mouna Fatima Zahra
Pr.MEDDAH Bouchra
Pr.MELHAOUI Adyl
Pr.MRABTI Hind
Pr.NEJJARI Rachid
Pr.OUBEJJA Houda
Pr.OUKABLI Mohamed *
Pr.RAHALI Younes
Pr.RATBI Ilham
Pr.RAHMANI Mounia
Pr.REDA Karim *

Pharmacologie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie-Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique et Bromatologie
Traumatologie orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologique
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie
Radiologie
Médecine Nucléaire
Pédiatrie
Endocrinologie et maladies métaboliques
Microbiologie
Psychiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Pharmacologie
Neuro-chirurgie
Oncologie Médicale
Pharmacognosie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique
Pharmacie Galénique [Vice-Doyen à la Pharmacie](#)
Génétique
Neurologie
Ophtalmologie

****Enseignant militaire***

Pr.REGRAGUI Wafa
Pr.RKAIN Hanan
Pr.ROSTOM Samira
Pr.ROUAS Lamiaa
Pr.ROUIBAA Fedoua *
Pr SALIHOUN Mouna
Pr.SAYAH Rochde
Pr.SEDDIK Hassan *
Pr.ZERHOUNI Hicham
Pr.ZINE Ali *

Neurologie
Physiologie
Rhumatologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Chirurgie Pédiatrique
Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr.EL KHATIB MOHAMED KARIM *

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Mai 2013

Pr. BOUSLIMAN Yassir*

Toxicologie

Mars 2014

Pr. ACHIR Abdellah
Pr.BENCHAKROUN Mohammed *
Pr.BOUCHIKH Mohammed
Pr. EL KABBAJ Driss *
Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
Pr. HARDIZI Houyam
Pr. HASSANI Amale *
Pr. HERRAK Laila
Pr. JEAIDI Anass *
Pr. KOUACH Jaouad*
Pr. MAKRAM Sanaa *
Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
Pr. SEKKACH Youssef*
Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Hématologie Biologique
Gynécologie-Obstétrique
Pharmacologie
CCV
Médecine Interne
Gynécologie-Obstétrique

Décembre 2014

Pr. ABILKACEM Rachid*
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila
Pr. BEKKALI Hicham *
Pr. BENAZZOU Salma
Pr. BOUABDELLAH Mounya
Pr. BOUCHRIK Mourad*
Pr. DERRAJI Soufiane*
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*
Pr. EL MARJANY Mohammed*
Pr. FEJJAL Nawfal
Pr. JAHIDI Mohamed*
Pr. LAKHAL Zouhair*
Pr. OUDGHIRI NEZHA
Pr. RAMI Mohamed
Pr. SABIR Maria
Pr. SBAI IDRISSE Karim*

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

Aout 2015

Pr. MEZIANE Meryem
Pr. TAHIRI Latifa

Dermatologie
Rhumatologie

****Enseignant militaire***

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2016

Pr. BENKABBOU Amine
Pr. EL ASRI Fouad*
Pr. ERRAMI Nouredine*
Pr. NITASSI Sophia

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

Juin 2017

Pr. ABI Rachid*
Pr. ASFALOU Ilyasse*
Pr. BOUAITI EL Arbi*
Pr. BOUTAYEB Saber
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim
Pr. HAFIDI Jawad
Pr. MAJBAR Mohammed Anas
Pr. OURAINI Saloua*
Pr. RAZINE Rachid
Pr. SOUADKA Amine
Pr. ZRARA Abdelhamid*

Microbiologie
Cardiologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Oncologie Médicale
Oncologie Médicale
Anatomie
Chirurgie Générale
O.R.L
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Chirurgie Générale
Immunologie

Mai 2018

Pr. AMMOURI Wafa
Pr. BENTALHA Aziza
Pr. EL AHMADI Brahim
Pr. EL HARRECH Youness*
Pr. EL KACEMI Hanan
Pr. EL MAJJAOUI Sanaa
Pr. FATIHI Jamal*
Pr. GHANNAM Abdel-Ilah
Pr. JROUNDI Imane
Pr. MOATASSIM BILLAH Nabil
Pr. TADILI Sidi Jawad
Pr. TANZ Rachid*

Médecine interne
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Radiothérapie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie-Réanimation
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Oncologie Médicale

Novembre 2018

Pr. AMELLAL Mina
Pr. SOULY Karim
Pr. TAHRI Rajae

Anatomie
Microbiologie
Histologie-Embryologie-Cytogénétique

Novembre 2019

Pr. AATIF Taoufiq*
Pr. ACHBOUK Abdelhafid *
Pr. ANDALOUSSI SAGHIR Khalid
Pr. BABA HABIB Moulay Abdellah*
Pr. BASSIR RIDA ALLAH
Pr. BOUATTAR TARIK
Pr. BOUFETTAL MONSEF
Pr. BOUCHENTOUF Sidi Mohammed *
Pr. BOUZELMAT HICHAM *
Pr. BOUKHRIS JALAL *
Pr. CHAFRY BOUCHAIB *
Pr. CHAHDI HAFSA*
Pr. CHERIF EL ASRI ABAD *
Pr. DAMIRI AMAL *

Néphrologie
Chirurgie réparatrice et plastique
Radiothérapie
Gynécologie-Obstétrique
Anatomie
Néphrologie
Anatomie
Chirurgie-Générale
Cardiologie
Traumatologie-Orthopédie
Traumatologie-Orthopédie
Anatomie pathologique
Neuro-chirurgie
Anatomie Pathologique

****Enseignant militaire***

Pr. DOGHMI NAWFAL *	Anesthésie-Réanimation
Pr. ELALAOUI SIDI-YASSIR	Pharmacie-Galénique
Pr. EL ANNAZ HICHAM*	Virologie
Pr. EL HASSANI MOULAY EL MEHDI*	Gynécologie-Obstétrique
Pr. EL HJOUJI ABDERRAHMAN *	Chirurgie Générale
Pr. EL KAOUI HAKIM *	Chirurgie Générale
Pr. EL WALI ABDERRAHMAN*	Anesthésie-Réanimation
Pr. EN-NAFAA ISSAM *	Radiologie
Pr. HAMAMA JALAL *	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Pr. HEMMAOUI BOUCHAIB*	O.R.L
Pr. HJIRA NAOUFAL *	Dermatologie
Pr. JIRA MOHAMED *	Médecine interne
Pr. JNIENE ASMAA	Physiologie
Pr. LARAQUI HICHAM *	Chirurgie-Générale
Pr. MAHFOUD TARIK *	Oncologie Médicale
Pr. MEZIANE MOHAMMED *	Anesthésie-Réanimation
Pr. MOUTAKI ALLAH YOUNES *	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. MOUZARI YASSINE *	Ophtalmologie
Pr. NAOUI HAFIDA *	Parasitologie-Mycologie
Pr. OBTEL MAJDOULINE	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. OURRAI ABDELHAKIM *	Pédiatrie
Pr. SAOUAB RACHIDA *	Radiologie
Pr. SBITTI YASSIR *	Oncologie Médicale
Pr. ZADDOUG OMAR*	Traumatologie-Orthopédie
Pr. ZIDOUH SAAD *	Anesthésie-Réanimation

****Enseignant militaire***

2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUE

PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie-chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr .BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie <u>Vice-Doyen chargé de la Rech. et de la Coop.</u>
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. RIDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

PROFESSEURS HABILITES :

Pr .BENZEID Hanane	Chimie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie-chimie
Pr .DOUKKALI Anass	Chimie Analytique
Pr .EL JASTIMI Jamila	Chimie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Histologie-Embryologie
Pr.LYAHYAI Jaber	Génétique
Pr. OUADGHIRI Mouna	Microbiologie et Biologie
Pr. RAMLI Youssef	Chimie
Pr. SERRAGUI Samira	Pharmacologie
Pr. TAZI Ahnini	Génétique
Pr. YAGOUBI Maamar	Eau, Environnement

Mise à jour le 09/04/2021

KHALED Abdellah

Chef du Service des Ressources Humaines

FMPR

****Enseignant militaire***

Dédicaces

A ma très chère maman Fatiha FEKKAR

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier pour tes efforts et ton support. Ton amour et affection me couvrent, ta bienveillance me guide et ta force m'inspire pour affronter les différents obstacles que cette vie m'impose. J'espère que dans ce travail tu trouveras ma profonde reconnaissance ainsi avoir répondu aux espoirs que tu as fondés en moi et réalisé aujourd'hui l'un de tes rêves.

A mes très chères sœurs Fadwa et Asmaa EL HACHIMI

Merci d'avoir fait partie de mon enfance et donc de former la personne que je suis aujourd'hui, je n'aurais pas pu le faire sans vos mots d'encouragement et votre présence quand j'en avais besoin. Je sais que je pourrai compter sur vous à n'importe quel moment.

A la mémoire de ma tante Saadia FEKKAR

*Partie trop tôt, j'aurais souhaité ta présence en ce jour pour partager ma joie.
Que ton âme repose en paix.*

A mon âme sœur Omaïma ISRAÏLE

My soulmate, you've been there for the better and for the worse, we have witnessed each other grow throughout these last six years, you've played a major part in becoming the version I am today and I hope we will never lose the special bond we have.

A mon très cher Yossr BOUÏJIM

2021 was a remarkable year because I got the opportunity to meet you, and since then you made my life happier and better. With you I learned how to be patient and how to let time do its own thing. Be sure that you can always count on me in your toughest days.

I have nothing but love for you and you shall know that you will forever hold a special place in my heart.

A mon amie Chadia BENHAMOU

To my study buddy and workout buddy, je n'oublierai jamais nos moments passés ensembles, nos nuits blanches, nos séances d'entraînement matinales. Tu es une vraie

source de motivation pour moi, et pour cela je t'en suis reconnaissante.

A mon amie Hala CHAFIAI

Je n'oublierai jamais quand tu m'as abordé le premier jour, sachant que j'étais une nouvelle venue au lycée, tu m'as tout de suite fait sentir que j'étais la bienvenue, nous nous sommes croisés à nouveau à l'université et on a fini par vivre les plus belles expériences de la vie ensemble. Je serai toujours reconnaissante d'avoir une personne joyeuse comme toi dans ma vie.

A mon amie Zineb ASSIMI

D'une simple rencontre dans un train de navette, à une co-chambre, jusqu'à devenir une amie précieuse. Je te remercie pour tous nos moments partagés ensemble ma chère.

A mon ami Ahmed ELRHAZ

Merci pour tes conseils et tes encouragements tout au long de nos années d'études, tu m'as été d'une aide et d'un soutien précieux.

Remerciements

A notre maître et président de thèse

Monsieur Jaouad EL HARTI

*Professeur de chimie thérapeutique, et chef de service de la pharmacie de
l'hôpital dentaire de Rabat.*

Je vous remercie infiniment, cher maître, pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger et présider le jury de cette thèse et pour le grand intérêt que vous avez porté pour ce travail. L'amabilité dont vous avez fait preuve en recevant cette thèse me marquera à jamais. Votre modestie, jointe à vos compétences professionnelles et humaines, seront pour nous un exemple dans l'exercice de notre profession. Veuillez trouver ici, l'expression de notre respect et de notre très haute considération.

A notre maître rapporteur de thèse

Monsieur Azeddine IBRAHIMI

*Professeur de biologie moléculaire, et directeur du laboratoire de
biotechnologie de Rabat*

Je vous remercie pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. J'ai eu le grand plaisir et le privilège de travailler sous votre direction et j'ai trouvé auprès de vous un conseiller et un guide. Vous m'avez reçu en toute circonstance avec sympathie et bienveillance. Votre compétence, votre dynamisme, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en moi une grande admiration et un profond respect.

Je souhaite être digne de la confiance que vous m'avez accordée. Veuillez trouver, cher Maître, dans ce travail l'expression de ma haute considération, ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude.

A notre maître et juge de thèse

Madame Mouna OUADGHIRI

Professeur de Microbiologie

J'ai été touchée par la bienveillance et la cordialité de votre accueil.

C'est un grand honneur de vous compter parmi les membres du jury de ma thèse.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A notre maître et juge de thèse

Madame N. EL HAFIDI

Professeur en Pédiatrie

Vous avez accepté avec gentillesse de juger notre travail et c'est pour moi un immense plaisir de vous voir siéger parmi le jury de notre thèse.

Veillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon grand respect.

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV	: Adeno-associated virus
ADA-SCID	: Adénosine désaminase-déficit immunitaire combiné sévère
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Adv	: Adénovirus
AMM	: Autorisation de mise sur le marché
ARN	: Acide ribonucléique
ARNg	: ARN guide
ARNm	: ARN messenger
BPF	: Bonnes pratiques de fabrication
BRCA1	: Breast cancer 1
CAR	: Chimeric Antigen Receptor
CARES	: CNS AIDS Research and Eradication Study
CAR-NK	: CAR-Natural Killer
CAS	: CRISPR associated protein
Cas9 RNP	: Ribonucléoprotéines Cas9
Cas9n	: Nickase de Cas9
CBNPC	: Cancer bronchique non à petites cellules
CCR5	: CC-Chemokine receptor 5
CD19	: Cluster of differentiation 19
CEP290	: Amaurose congénitale de Leber de type 10
CFDA	: China Food and Drug Administration
CFTR	: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPP	: Cell Penetrating Peptides
CRISPR	: Clustered regularly interspaced palindromic repeats
crRNA	: Cas9-ARN CRISPR
CXCR4	: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
DARPA	: Defense Advanced Research Products Agency
DCI	: Dénomination commune internationale
DHFR	: Dihydrofolate réductase
DIY	: Do it yourself
DPI	: Diagnostic Pré-Implantatoire
DSB	: Double Stranded Breaks

ESC	: Souches embryonnaires
FDA	: Food and Drug Administration
FIV	: Fécondation In Vitro
FNT	: Facteur de nécrose tumorale
FokI	: Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I
FS	: Feldan Shuttle
FTIH	: First Time In Human
GDEPT	: Thérapie enzymatique par prodrogue dirigée par gène
GM-CSF	: Facteur humain stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages
GMP	: Certificat Good manufacturing practice
HAART	: Highly active antiretroviral therapy
HAT	: Hypoxanthine aminopétrine thymidine
HDR	: Recombinaison homologue
HGPRT	: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
HLA	: Human leucocyte antigen
HSCI	: Institut des cellules souches humaines
HSV-1	: <i>Herpes simplex</i> de type 1 atténué
iap	: isozyme de la phosphatase alcaline
ICSI	: Intracytoplasmic sperm injection
iPSC	: Cellules souches pluripotentes induites par CCR5 Δ 32
ITRs	: Inverted Terminal Repeat
Kbp	: Kilo base pairs
LCTR	: Les grands groupes de répétitions en tandem
LPLD	: Déficit familial en lipoprotéine lipase
LV	: Lentiviraux
miRNA	: microrna
NASA	: National Aeronautics and Space Administration
NGS	: Séquençage de nouvelle génération
NHEJ	: Jonction d'extrémités non homologues
NK	: Tueuses naturelles
NOHL	: Neuropathie Optique Hériditaire de Leber
OEB	: Office européen des brevets
OGMs	: Organisms génétiquement modifiés
OTC	: Ornithine transcarbamylase
PA	: Phosphatase alcaline

PAM	: Motif adjacent au protospacer
PBMC	: Cellules mononucléaires du sang périphérique
PEG-ADA	: Polyéthylène glycol adénine désaminase
PepMoV	: Virus de la marbrure du poivron
PI	: Propriété intellectuelle
PMA	: Procréation assistée
PPO	: Polyphénol oxydase
REP	: Séquences palindromiques extragéniques répétitives
RISC	: RNAi Induced Silencing Complex
RNAi	: ARN interférents
RNase H	: Ribonucléase H
RSV	: Virus de sacrome de Rous
SaCas9	: Streptocoque aureus
SFDA chinoise	: Administration nationale des produits médicaux
SMA	: Amyotrophie musculaire spinale
SpCas9	: Steptocoque pyogene
SPIDR	: Répétitions directes entrecoupées d'espaceurs
SRSR	: Courtes répétitions régulièrement espacées
TALE	: Transcription activator- like effector
TALEN	: Transcription activator-like effector nuclease
TEV	: Virus de l'attaque du tabac
TFF	: Tangential flow filtration
TIL	: Lymphocytes Infiltrant la Tumeur
tracrRNA	: Trans-activating CRISPR RNA
TRM	: Thérapie de remplacement mitochondrial
UE	: Union européenne
UNESCO	: Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture
USDA	: United States department of agriculture
USPTO	: United States Patent and Trademarks Office
VEGF	: Facteur de croissance endothélial vasculaire
VIH-1	: Rétrovirus de l'immunodéficience humaine
VSV-G	: Virus de la stomatite vésiculaire G
Wt	: Type sauvage
ZFN	: Zinc finger nuclease

**LISTE
DES ILLUSTRATIONS**

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Chronologie mettant en évidence certaines étapes importantes de la thérapie génique(2).....	6
Fig. 2 : Schéma simplifiant le principe de transformation(6)	7
Fig. 3 : Bases azotées de l'ADN(8).....	8
Fig. 4 : Cliché en croix obtenu à partir d'un bombardement de rayon X sur un amas d'ADN autrement connu sous le nom de Photo 51(9)	9
Fig. 5 : Structure de l'ADN(11).....	10
Fig. 6 : Schéma simplifié de la synthèse d'une protéine à partir d'un brin d'ADN(13)	11
Fig. 7 : Schéma du processus de réplication de l'ADN(15)	11
Fig. 8 : Principe de la sélection HAT. La dihydrofolate réductase (DHFR) est nécessaire à la synthèse de novo des acides nucléiques (essentielle à la synthèse de l'ADN pendant la prolifération cellulaire). L'aminoptérine, quant à elle, est un composé présent dans le milieu HAT qui inhibe la synthèse de novo des purines en inhibant la DHFR. Les purines peuvent être fournies par la voie alternative de récupération grâce à l'enzyme hypoxan-thine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Cependant, les cellules dépourvues d'activité HGPRT meurent en présence d'aminoptérine, car elles ne peuvent pas synthétiser d'ADN (A). Les cellules HGPRT(-) peuvent cependant être sauvées en isolant l'ADN des cellules HGPRT(+) et en le transférant aux cellules HGPRT(-) (B), c'est-à-dire la sélection HAT (2).....	14
Fig. 9 : Le premier CRISPR trouvé dans E. coli. Suite à l'analyse du gène iap de E. coli, une séquence répétitive très ordonnée a été trouvée en aval du gène iap. L'unité de séquence conservée a été répétée 5 fois avec une longueur constante d'espaces en 1987. Il s'avère que la répétition a eu lieu 14 fois au total par l'analyse ultérieure du génome. Le groupe de gènes cas a également été identifié dans la région en aval. nt, nucléotides(38).....	19
Fig. 10 : Processus d'acquisition du système immunitaire par CRISPR-Cas. (Haut) Adaptation. L'ADN envahissant est reconnu par les protéines Cas, fragmenté et incorporé dans la région espaceur de CRISPR, et stocké dans le génome. Expression (en bas). Le pré-ARNr est généré par la transcription de la région CRISPR et est transformé en unités d'ARN plus petites, appelées ARNr. Interférence (en bas). En profitant de l'homologie de la séquence espaceur présente dans l'ARNr, l'ADN étranger est capturé, et un complexe avec la protéine Cas ayant une activité nucléase clive l'ADN(38).....	24
Fig. 11 : Les deux voies de la thérapie génique(71)	29
Fig. 12 : Les différentes applications de la thérapie génique(72).....	30
Fig. 13 : Mécanisme d'action d'un ARN antisens(74).....	32

Fig. 14 : Principe de l'inactivation d'un gène par ARN interférent (ARNi)(77)	35
Fig. 15 : Mécanisme d'action des virus oncolytiques(86).....	37
Fig. 16 : Illustration d'une paire de ZFNs liés à l'ADN. Les doigts de zinc sont représentés par des boîtes ouvertes, avec de courtes lignes verticales indiquant les principaux contacts avec les paires de bases de l'ADN. Les domaines de clivage FokI sont représentés par des cases ombragées, avec des sites de clivage communs, espacés de 4 à 5 cm.....	40
Fig. 17 : Organisation des TALE et TALEN. A. Les TALE (transcription activator-like effector) sont des facteurs de transcription produits par les bactéries pathogènes du genre <i>Xanthomonas</i> . Injectés dans les plantes par le système de sécrétion de type III, ils sont importés dans le noyau, se lient aux boîtes UTP et activent les gènes de susceptibilité, tels <i>upa20</i> , <i>os8n3</i> , <i>ostfIIag1</i> ou <i>ostfx1</i> de la plante hôte. Les TALE sont constitués de répétition d'un motif de 34 acides aminés. Au sein de ces répétitions, les acides aminés 12 et 13 (en bleu) reconnaissent un nucléotide spécifique. B. Les TALE se lient à leurs cibles en formant une hélice qui s'enroule autour de l'ADN. Chaque répétition du TALE reconnaît un nucléotide adjacent. C. Il existe un code de reconnaissance précis entre les acides aminés 12-13 et les nucléotides cibles : N, Asp ; I, Ile ; H, His ; D, Asp ; K, Lys. D. Association d'une paire de TALEN et structure de son site d'ADN cible. Nt : nucléotide(97).....	41
Fig. 18 : Mécanisme de fonctionnement des méganucléases de homing(89).....	43
Fig. 19 : La nucléase Cas9 de <i>S. pyogenes</i> (en jaune) est ciblée sur l'ADN génomique (le locus EMX1 humain est illustré à titre d'exemple) par un ARNg composé d'une séquence guide de 20 nt (bleu) et d'un échafaudage (rouge). La séquence guide s'apparie avec la cible ADN (barre bleue sur le brin supérieur), directement en amont d'un motif adjacent 5'-NGG requis (PAM ; rose). Cas9 crée un DSB ~3 pb en amont du PAM (triangle rouge) (102).	47
Fig. 20 : Retouche génomique par le système Crispr-cas9(105).....	48
Fig. 21 : Voies de réparation de l'ADN induite par une coupure double brin(66).....	49
Fig. 22 : Différents challenges à surmonter pour le transfert des éléments de Cas9/gRNA (111).....	53
Fig. 23 : Plusieurs sérotypes de AAV permettent de cibler précisément différents types de tissus. Chaque sérotype de AAV présente un tropisme particulier pour certains tissus. Notamment, le sérotype AAV9 (gris) permet de cibler à la fois le cœur mais aussi les muscles squelettiques (141)...	58
Fig. 24 : Principe de fonctionnement du Feldan Shuttle pour la livraison de protéines et/ou d'acides nucléiques. Par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, le cargo se couple au Feldan Shuttle. Au contact de la membrane des cellules, le complexe Feldan Shuttle/cargo peut être transduit directement au travers de la bicouche lipidique ou transite par l'endosome. Une fois dans le cytoplasme, le complexe se dissocie pour libérer le cargo.(156).....	61
Fig. 25 : Architecture plasmidique(159).....	62
Fig. 26 : Tropisme des sous types d'AAV (160).....	64

Fig. 27 : Cycle viral de HIV-1 divisé en étapes (166)	69
Fig. 28 : Timothy Brown en 2011(171).....	71
Fig. 29 : Application de la technologie CRISPR/Cas9 pour éradiquer les cellules réservoirs du VIH. La principale application de la technologie CRISPR/Cas9 pour éradiquer les cellules réservoirs du VIH (a) est d'éliminer (b) ou de perturber le provirus du VIH (c) du génome des cellules réservoirs hôtes. En détail, plusieurs sgRNA, qui ciblent deux ou plusieurs sites du provirus du VIH, sont appliqués aux cellules réservoirs du VIH avec Cas9. Cette action entraîne des coupures multiples au niveau des sites multiples du provirus du VIH, ainsi le provirus est retiré de l'ADN de la cellule hôte (b) ou le provirus est perturbé (c). L'ADN des cellules hôtes réservoirs du VIH est ensuite réparé par jonction terminale non homologue de l'ADN ou par réparation dirigée par homologie lorsque le modèle de réparation homologue est disponible (non montré).(173)	72
Fig. 30 : Répartition des indications en thérapie génique(174).....	73
Fig. 31 : Estimation de la croissance du marché de la thérapie génique en oncologie 2021-2025 : une croissance estimée à 20% (198)	84
Fig. 32 : L'analyse du marché des principaux acteurs du pipeline de thérapie génique en phase clinique précoce(213).....	88
Fig. 33 : Principe de productions du vecteur AAV par transfection(228).....	91
Fig. 34 : Couverture de la revue Science en 2017 révélant les porcs miniatures (Tea cup piglets) édités par CRISPR-cas9 (250)	101
Fig. 35 : Deux Beagles Deux beagles, Hercules (à gauche) et Tiangou (à droite), sont les premiers chiens dont un gène a été modifié à l'aide d'un outil appelé CRISPR/Cas9. Les chercheurs ont muté les gènes de la myostatine des chiens afin d'augmenter la quantité de muscle produite par les beagles(251).....	101
Fig. 36 : De gauche à droite : les kits CRISPR commercialisés par l'entreprise ODIN et son fondateur Josiah Zayner(256)	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples du rapport des bases azotées par espèces(8) 8

Tableau 2 : Résumant les principales différences entre le miRNA et le siRNA(78)..... 35

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	2
1. HISTORIQUE	5
1.1. Thérapie génique	5
1.1.1. Définition	5
1.1.2. Le principe de transformation	6
1.1.3. L'ADN comme support du matériel génétique	8
1.1.4. Transduction.....	12
1.1.5. Transfert du premier gène héritable	12
1.1.6. Premières étapes de thérapie génique	15
1.1.7. La mort de Jesse Gelsinger	18
1.1.8. Conclusion	18
1.2. CRISPR cas9	18
1.2.1. Découverte de CRISPR chez les archées	20
1.2.2. Identification des gènes Cas.....	21
1.2.3. Découverte de la fonction CRISPR.....	22
1.2.4. Popularité explosive du terme CRISPR	25
2. TECHNIQUES DE LA THÉRAPIE GÉNÉRIQUE	29
2.1. Gene silencing	31
2.1.1. Les ARN antisens.....	31
2.1.2. Les ARN interférents	33
2.2. Transfert d'acides nucléiques in vivo	35
2.2.1. Ajout d'une protéine fonctionnelle	35
2.2.2. Utilisation de gène suicide	36

2.3. Virus Oncolytique	36
2.4. La technique des CAR T cell	37
2.5. Gene editing in vivo	39
2.5.1. Outils de clivage / Techniques	39
2.5.1.1. Zinc-Finger Nucleases	39
2.5.1.2. TALEN	40
2.5.1.3. Méganucléases	42
3. CRISPR CAS 9 : RÉÉCRIRE NOTRE HISTOIRE	46
3.1. Mécanisme	46
3.2. Rôle des mécanismes de réparation de l'ADN dans l'édition génomique	49
3.2.1. Réparation dirigée par homologie	50
3.2.2. Réparation non-homologue par jonction des extrémités	50
3.2.3. Comparaison entre HDR et NHEJ	51
4. MOYENS D'ACHEMINEMENT DU SYSTÈME CRISPR CAS9	53
4.1. Vectorisation de CRISPR-Cas9 par méthodes physiques	54
4.1.1. L'électroporation	54
4.1.2. L'ultrason	54
4.2. Vectorisation de CRISPR-Cas9 par les virus : Les vecteurs viraux	54
4.2.1. Les rétrovirus et lentivirus	55
4.2.2. Les adénovirus	56
4.2.3. Les virus adéno-associés	57
4.3. Les vecteurs non viraux	59
4.3.1. Liposomes, polymères et nanoparticules	59
4.3.2. Peptides de transduction et de perméabilisation	60
4.4. Plasmide exprimant Cas9 et le gRNA	62

4.5. Quel système d'expression choisir ?.....	64
5. CHAMPS D'APPLICATION DU SYSTÈME CRISPR CAS9	67
5.1. En agriculture	67
5.1.1. Cas du champignon qui ne brunissait pas	67
5.1.2. Prémunition des tomates contre les potyvirus.....	68
5.2. En infectiologie	68
5.2.1. Cas du VIH.....	68
5.3. Cancérologie	73
5.3.1. Immunothérapie antitumorale et CRISPR-Cas9	74
5.4. Cécité	75
6. LES ASPECTS ÉCONOMIQUES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE	80
6.1. Produits commercialisés	80
6.1.1. Neovasculgen®	80
6.1.2. Imlygic®.....	80
6.1.3. Gendicine®.....	81
6.1.4. Luxturna®	81
6.1.5. Oncorine®.....	81
6.1.6. Glybera®	82
6.1.7. Zolgensma®	82
6.1.8. Lumevoq®.....	82
6.2. Le marché des produits de thérapie cellulaire et génique : Autorisations, abandons et coûts ...	83
6.2.1. Autorisations	83
6.2.2. Abandons	85
6.2.3. Coûts	85
6.2.4. Conclusion	86

6.3. Laboratoires développant les thérapies géniques	87
6.4. Challenges face à la production des thérapies géniques	89
6.4.1. Upstream	90
6.4.2. Downstream.....	92
7. LE Paysage Éthique Et Politique De La Thérapie Génique	95
7.1. L'édition de la lignée germinale par CRISPR/Cas9 et les modifications héréditaires.....	96
7.2. Conclusions de l'édition CRISPR/Cas9 sur des zygotes humains.....	97
7.3. Considérations éthiques sur l'édition du génome.....	98
8. BIOHACKERS : L'USAGE DÉTOURNÉ DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE	104
8.1. DIY Bio et laboratoires communautaires	104
8.2. Le potentiel de préjudice	106
8.3. CRISPR entre démocratisation et potentiel danger de biosécurité.....	107
8.4. GENE DRIVE : impact écologique.....	108
CONCLUSION.....	112
RÉSUMÉ.....	114
RÉFÉRENCES.....	118

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Trois décennies après ses premiers pas hésitants chez l'homme, la thérapie génique apparaît comme une option thérapeutique pour un nombre restreint mais croissant de maladies. Bien que le concept ait été confronté à des incertitudes scientifiques et éthiques lorsqu'il a été lancé dans les années 1970, les fondements de cette approche - remplacer ou fixer un seul gène responsable de la maladie - se sont avérés solides. Les chercheurs ont mis au point différents moyens de corriger ou d'influencer le fonctionnement des gènes d'une personne et ont utilisé ces techniques pour créer des thérapies pour plusieurs maladies du sang, ainsi que pour des maladies dégénératives des yeux et des muscles.

Aujourd'hui, le domaine commence à mûrir et à dépasser ces tactiques initiales. Des progrès constants ont rendu l'administration de gènes plus sûre et plus efficace, ce qui a conduit à des dizaines d'essais sur l'homme dans de nouveaux tissus, comme le foie et le cœur. D'autres approches vont au-delà de la définition initiale de la thérapie génique, avec des outils moléculaires de pointe qui corrigent les erreurs au sein des gènes plutôt que de remplacer ou d'insérer un gène entier, parmi eux : CRISPR-cas9. La manière la plus simple d'expliquer ce qui se trouve derrière l'acronyme difficilement prononçable CRISPR-cas9 est : un ciseau génétique inspiré de la réaction immunitaire bactérienne déployée contre les infections virales.

Pourtant, malgré les progrès récents, la thérapie génique se heurte à de nombreux obstacles sur la voie d'une utilisation clinique plus large - le principal étant de savoir comment cibler des tissus spécifiques sans déclencher de réponse immunitaire. L'amélioration de l'efficacité et du coût de la fabrication constitue un défi plus vaste et à long terme : Aux États-Unis, les traitements par thérapie génique coûtent actuellement en moyenne plus de 400 000 dollars par dose. Néanmoins, avec un tel potentiel et tant de patients ayant besoin de nouvelles solutions, la thérapie génique ne peut que continuer à gagner en importance et en puissance.

Dans ce travail, on abordera d'abord le concept d'ADN, depuis sa découverte jusqu'à la possibilité de sa modification, en passant par l'histoire de découverte de la biotechnologie CRISPR-cas9. Ensuite on insistera sur les techniques de la thérapie génique, notamment le mécanisme du système CRISPR-cas9 et ses moyens d'acheminements, les perspectives en hématologie, infectiologie et oncologie, où seront redéfinies les différentes cibles du ciseau moléculaire et les applications qui en découlent. Enfin, on fera une mise au point sur les paysages économique et éthique de la thérapie génique.

HISTORIQUE

1. HISTORIQUE

1.1. Thérapie génique :

1.1.1. Définition :

L'Agence européenne des médicaments (EMA) définit qu'un médicament de thérapie génique est un médicament biologique qui répond aux deux caractéristiques suivantes :

(a) il contient une substance active qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé chez l'homme ou administré à celui-ci en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ; (b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique est directement lié à la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient, ou au produit de l'expression génétique de cette séquence. Les médicaments de thérapie génique ne comprennent pas les vaccins contre les maladies infectieuses.(1)

La Food and Drug Administration (FDA) définit la thérapie génique comme des produits "qui exercent leurs effets par transcription et/ou traduction de matériel génétique transféré et/ou par intégration dans le génome de l'hôte et qui sont administrés sous forme d'acides nucléiques, de virus ou de micro-organismes génétiquement modifiés. Les produits peuvent être utilisés pour modifier des cellules in vivo ou transférés à des cellules ex vivo avant d'être administrés au receveur".(2)

En général, la thérapie génique peut être classée en deux catégories : la thérapie génique germinale et la thérapie génique somatique. La différence entre ces deux approches est que dans la thérapie génique somatique, du matériel génétique est inséré dans certaines cellules cibles, mais la modification n'est pas transmise à la génération suivante, alors que dans la thérapie génique germinale, le gène thérapeutique ou modifié sera transmis à la génération suivante. Cette différence est importante, car la législation actuelle n'autorise la thérapie génique que sur les cellules somatiques. La Figure 1 met en évidence certains des jalons de l'histoire de la thérapie génique.

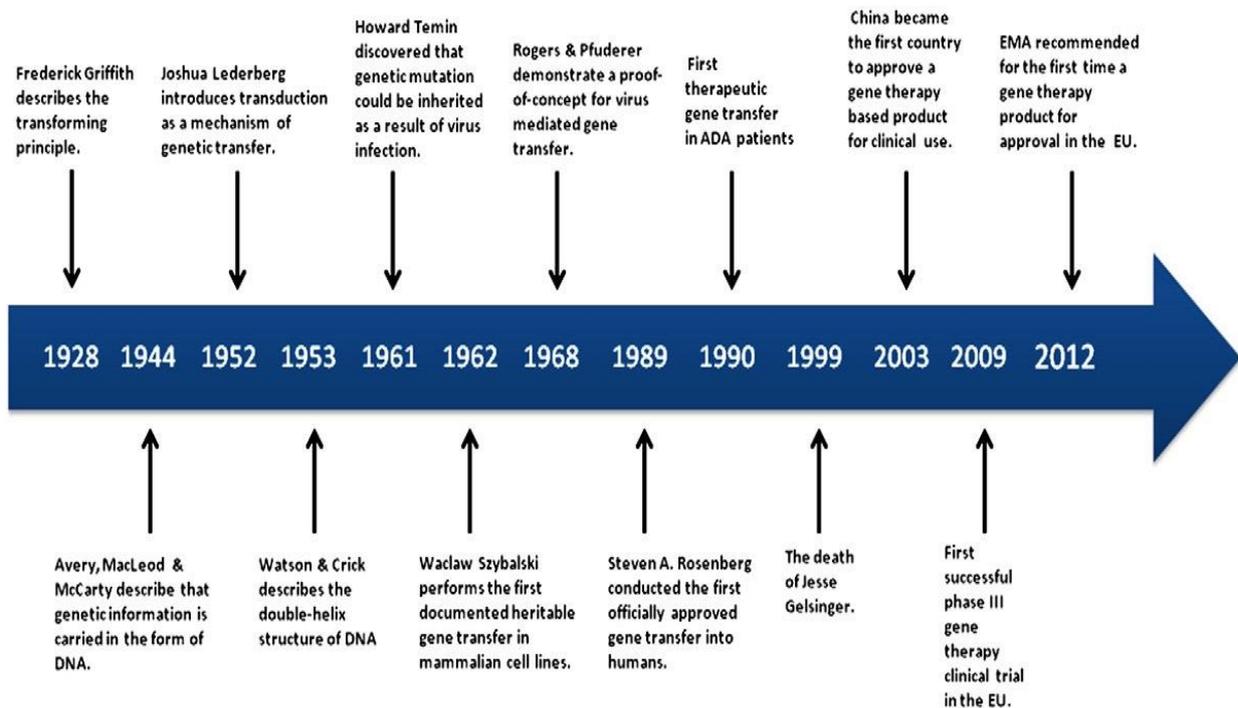


Fig. 1 : Chronologie mettant en évidence certaines étapes importantes de la thérapie génique(2)

1.1.2. Le principe de transformation :

Frederick Griffith était un bactériologiste britannique qui s'est concentré sur l'épidémiologie et la pathologie de la pneumonie bactérienne. En 1928, il a publié un rapport (connu également sous le nom de "Griffith's Experiment"), dans lequel il décrit la transformation d'un type de pneumocoque non virulent en un type virulent.(3) Dans cette étude, il a mélangé des bactéries vivantes de la forme R non virulente du pneumocoque de type I avec des bactéries inactivées par la chaleur de la forme S virulente du pneumocoque de type II, puis a infecté des souris avec ce mélange. À sa grande surprise, le résultat fut que les souris développèrent une pneumonie et moururent. En outre, Griffith a pu isoler des colonies de la forme S du pneumocoque de type II dans le sang de ces souris. Comme la forme S virulente originale du pneumocoque de type II était inactivée par la chaleur, il en a conclu que non seulement la forme R du pneumocoque s'était transformée en forme S, mais aussi que le type de pneumocoque s'était transformé de type I en type II. Il s'agissait d'un phénomène jamais observé auparavant. Un an plus tard, Dawson et Sia ont confirmé les résultats de Griffith et ont même mis au point une méthode pour réaliser la transformation in vitro (4).

Peu de temps après, Dawson a quitté le laboratoire et le jeune scientifique James L. Alloway a poursuivi les études sur ce sujet et a poussé la recherche un peu plus loin. Il a perturbé la forme S du pneumocoque, libérant ainsi son contenu intracellulaire, et l'a filtré à travers un filtre fin. Il a ensuite ajouté cet extrait acellulaire à une culture en croissance de la forme R du pneumocoque et il a observé que la transformation avait lieu(3). Il en a conclu que quelque chose dans l'extrait acellulaire était responsable de la transformation des bactéries pneumocoques. Il a appelé ce "quelque chose" le "principe de transformation". Ne sachant pas ce que c'était, il a réalisé des études ultérieures et a observé qu'il pouvait être précipité de la solution avec de l'alcool(5).

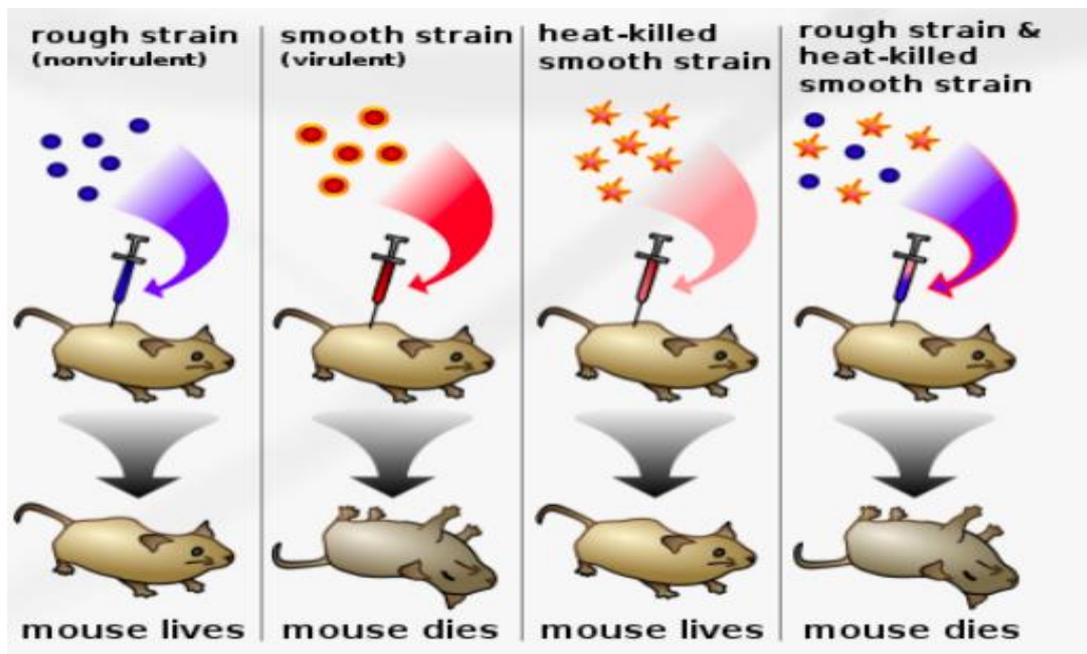


Fig. 2 : Schéma simplifiant le principe de transformation(6)

Ce n'est qu'en 1941 qu'Avery et McCarty se sont concentrés sur la purification de la substance transformante dans le but d'identifier la substance à l'origine de la transformation. Finalement, McCarty et Avery ont démontré que la transformation était causée par l'acide désoxyribonucléique (ADN) (7). C'était en 1944 et à une époque où la plupart des généticiens, y compris Avery lui-même, pensaient que les gènes devaient être composés de protéines. À partir de là, la compréhension scientifique de la base moléculaire de la vie a changé de façon spectaculaire et l'ADN est devenu un sujet de recherche intense.

1.1.3. L'ADN comme support du matériel génétique :

L'ADN tarde à être reconnu comme le support de l'hérédité, au départ le concept le plus largement répandu désigne la structure de l'ADN comme une molécule simple, régulière et monotone. C'est notamment Phoebus Levene qui décrit l'enchaînement répétitif de quatre bases azotées et la présence de désoxyribose dans sa structure.

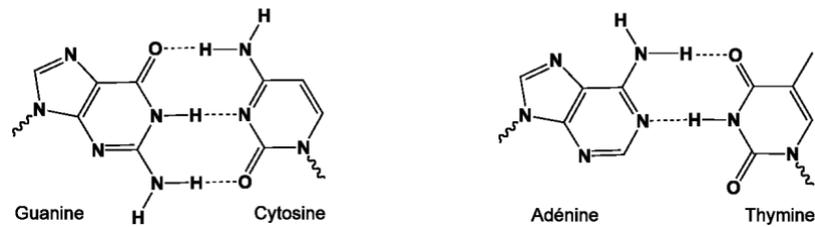


Fig. 3 : Bases azotées de l'ADN(8)

Par la suite, dans les années 50, Erwin Chargaff, grâce aux avancées de la chromatographie sur papier, entame des travaux sur les bases azotées de l'ADN. Il découvre alors un rapport d'appariement entre deux paires de base qu'il ne tarde à associer : l'adénine / la thymine, et la cytosine / la guanine que l'on écrit A/T et C/G. Il montre ainsi que le rapport:

1. - Purine / Pyrimidine = $(A+G)/(C+T)= 1$ et $A/T=1$, $G/C=1$ quelle que soit l'espèce
2. - $(A+T)/(C+G)$ est variable selon les espèces, mais constant pour tous les membres d'une espèce donnée, il caractérise ainsi l'espèce (Tableau 1). Par exemple :

Origine de l'ADN	A	G	C	T	A/T	G/C	(A+T)/(C+G)
<i>Thymus de bovin</i>	28,2	21,5	21,2	27,8	1,01	0,96	1,3
<i>Rate bovine</i>	27,9	22,7	20,8	27,3	1,02	1,02	1,25
<i>Sperme bovin</i>	28,7	22,2	20,7	27,2	1,05	1,01	1,26

Tableau 1 : Exemples du rapport des bases azotées par espèces(8)

Il en déduit que l'ADN est une molécule polymérique, qui n'est plus monotone comme l'avancé Levene, mais qui occupe une place centrale dans les mécanismes héréditaires et est capable de contenir de l'information. Il publie par la suite que le rapport entre ces bases azotées est identique quelles que soient les espèces qu'il étudie, cette nouvelle observation sera le fondement sur lequel se basera Watson et Crick dans l'élaboration du modèle de la structure de l'ADN.

Puis, en 1951, Rosalind Franklin après, avoir réalisé un bombardement de rayons X sur un échantillon concentré d'ADN extrait du thymus de veau observe une structure organisée de l'ADN. A la suite de cette expérience, de nouveaux clichés sont pris afin d'étudier la diffraction des rayons, qui plus tard, conduira Watson et Crick à proposer le modèle de double hélice d'ADN (Figure 4)

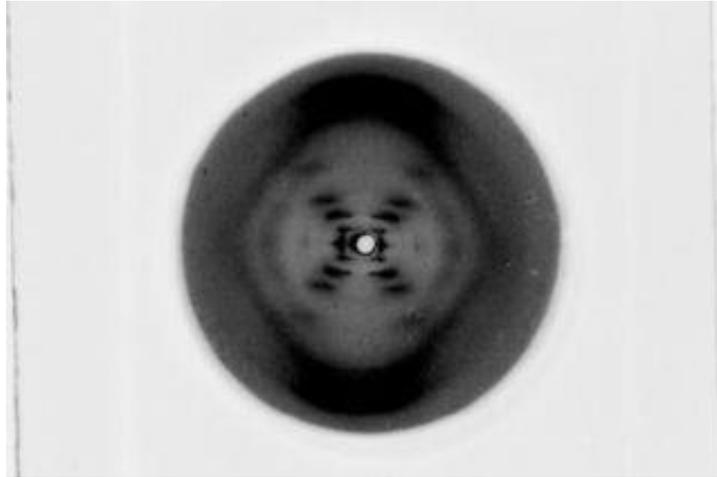


Fig. 4 : Cliché en croix obtenu à partir d'un bombardement de rayon X sur un amas d'ADN autrement connu sous le nom de Photo 51(9)

C'est en 1953 que Watson et Crick découvrent la structure en double hélice de l'ADN(10). Leurs connaissances sur cette molécule commencent à s'étayer :

- L'ADN est composé de désoxyribose, de base azotées et de groupements phosphate
- Les bases azotées ont des rapports identiques : A/T C/G suite aux travaux de Chargaff
- Avec les progrès de la microscopie électronique, le diamètre de la molécule d'ADN est de 20Å, ce qui laissait suggérer que la molécule comportait deux chaînes de désoxyribose- phosphate.

C'est en se basant sur ces acquis, couplés aux données biochimiques et cristallographiques, qu'ils concluent à une hélice double brins dont les groupements phosphates et désoxyribose sont opposés. Sur les sucres, sont fixées les bases azotées s'opposant symétriquement grâce aux liaisons hydrogène qui les maintiennent en vis-à-vis et

bloquent la structure en double hélice dextre anti-parallèle. A chaque thymine s'oppose une adénine, et à chaque cytosine une guanine ; elles se lient entre elles réciproquement par 2 et 3 liaisons hydrogène (Figure 5). Les deux brins sont alors qualifiés de complémentaires. En 1962, Crick, Watson et Wilkins reçurent le prix Nobel pour cette avancée majeure du XXème siècle.

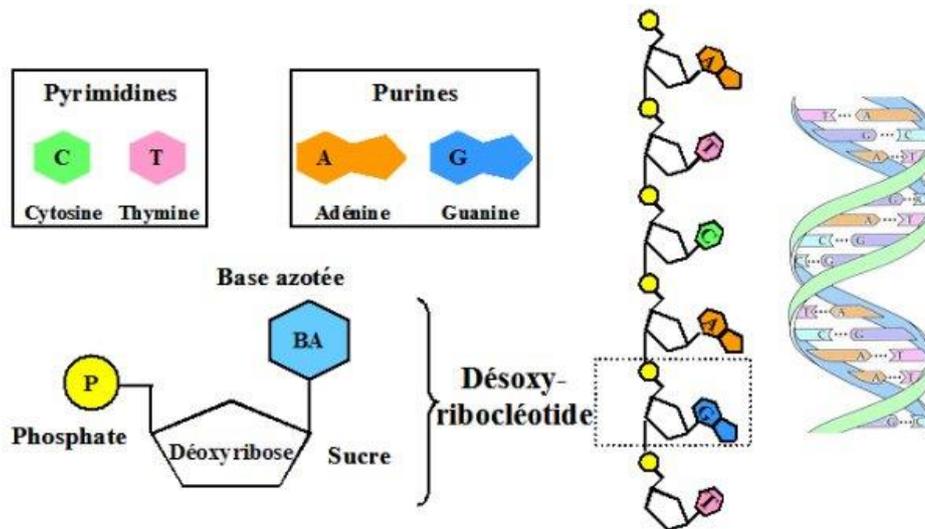


Fig. 5 : Structure de l'ADN(11)

Lorsque l'on s'intéresse à la sémantique du code génétique, la structure du support de l'hérédité offre une multitude de séquences possibles, 4^n possibilités pour n bases. En se basant sur cette possibilité, et en recoupant ceci avec la connaissance du code génétique, l'enchaînement des nucléotides détermine celui des acides aminés lui-même déterminant la structure de la protéine codée ; tout cela à la suite de deux phénomènes cellulaires majeurs, la transcription, puis la traduction. A partir de la structure à une dimension qu'est l'ADN, ce processus conduit à la synthèse de structure à 3 dimensions – régies par les lois de la thermodynamique – les protéines, dont la forme détermine la fonction(12).

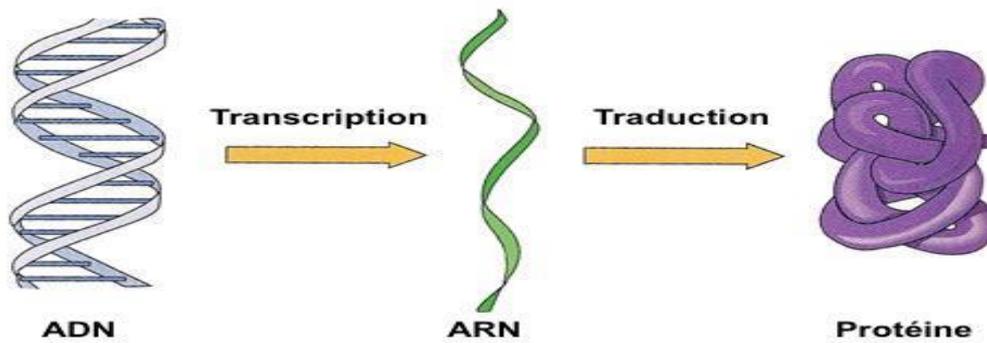


Fig. 6 : Schéma simplifié de la synthèse d'une protéine à partir d'un brin d'ADN(13)

En 1940, l'équipe du Phage, derrière Al Hershey avec Delbrück et Pauling, avait avancé l'idée d'une propriété d'auto-réplication de l'ADN, effectuée par une structure intermédiaire, qui réaliserait un négatif dont le moule produirait une structure identique à son image(14). Cette théorie est révisée par Watson et Crick qui mentionnent dans leur publication (12) la possibilité d'un mécanisme de réplication du matériel génétique basé sur la conservation de l'enchaînement des bases azotées. Cet appariement complémentaire des bases azotées de l'ADN soutient l'idée que l'ADN pourrait être à la fois matrice et participant pour la constitution de deux nouvelles molécules d'ADN suite à la séparation du double brin formant l'hélice. Chaque brin devenant alors matrice pour la synthèse du brin complémentaire. Ainsi, ce processus de réplication aboutit à la formation de deux nouvelles molécules d'ADN identiques entre elles, et identiques à la molécule initiale selon un modèle semi conservatif (Figure 7).

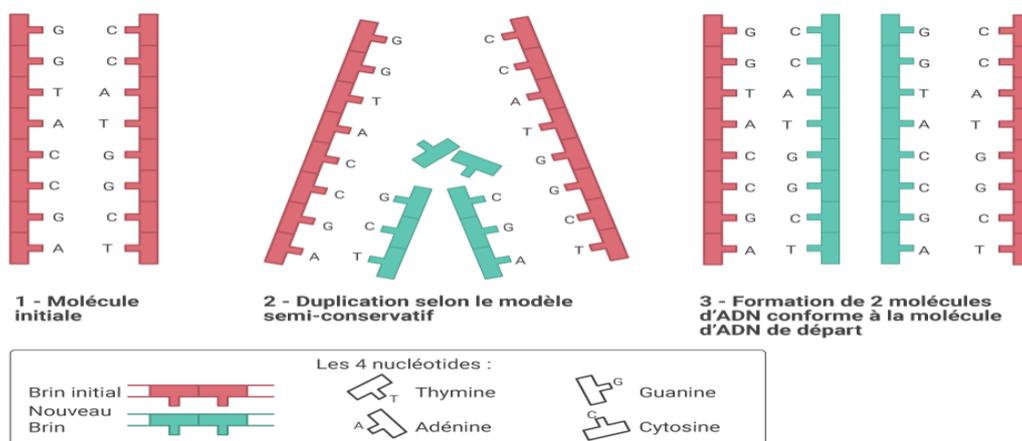


Fig. 7 : Schéma du processus de réplication de l'ADN(15)

1.1.4. Transduction

Joshua Lederberg était un généticien et microbiologiste qui a reçu le prix Nobel en 1958 pour ses travaux sur la génétique bactérienne. Il a découvert que certaines bactéries peuvent transférer du matériel génétique par accouplement (c'est-à-dire par conjugaison), ce qui décrit un autre mécanisme de transfert de matériel génétique en plus de la transformation bactérienne(16). En outre, Lederberg a découvert avec Norton Zinder un troisième mécanisme de transfert génétique dans les bactéries, appelé transduction (17). Ils ont observé que la recombinaison de mutants de *Salmonella* résistants aux nutriments et aux médicaments avec la forme sauvage pouvait avoir lieu même lorsqu'ils étaient séparés par un filtre de verre fin. Ils ont soutenu qu'un "filtrat" actif était responsable du transfert des traits héréditaires entre les souches bactériennes(17). Lorsqu'ils ont purifié l'agent, ils ont découvert qu'il n'était pas constitué d'ADN pur, mais plutôt d'un mélange d'ADN, et qu'il s'agissait d'un bactériophage de *Salmonella typhimurium* responsable du transport de l'ADN d'une bactérie à une autre. Zinder et Lederberg ont introduit le terme "transduction" pour décrire ce mécanisme. Cette découverte revêt une importance scientifique fondamentale, car elle explique comment des bactéries d'espèces différentes peuvent acquérir très rapidement une résistance à un même antibiotique. La compréhension de base, à savoir que les phages peuvent transférer du matériel génétique, est un phénomène qui a initié la recherche de ses avantages potentiels en tant qu'outil et qui a été rapidement étendu aux virus eucaryotes.

1.1.5. Transfert du premier gène héritable :

Waclaw Szybalski avait commencé des études pionnières sur les phages lambda au McArdle Laboratory for Cancer Research, à la faculté de médecine de l'université du Wisconsin-Madison. Il s'intéressait à la manière dont les gènes sont transférés, modifiés et régulés. Szybalski savait que les cellules sont capables d'absorber de l'ADN étranger. Toutefois, personne n'avait réussi à démontrer la transformation héréditaire d'un caractère biochimique jusqu'en 1962, date à laquelle Szybalski a publié son étude intitulée "DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait"(18). Dans cette étude, Szybalski a décrit une technique permettant de sélectionner des cellules génétiquement modifiées en fonction de leur phénotype (Fig 8). Son concept repose sur le fait que les cellules ont besoin

de la dihydrofolate réductase (DHFR) pour la synthèse de novo des acides nucléiques, en particulier la purine. Lorsque la DHFR est inhibée, la cellule n'a d'autre choix que d'utiliser une autre voie de récupération, qui fait appel à l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Comme son nom l'indique, l'HGPRT est une transférase qui catalyse la conversion de l'hypoxanthine en inosine monophosphate et de la guanine en guanosine monophosphate, qui peuvent être utilisées pour la synthèse des purines. Sur la base de ces connaissances, Szybalski a établi des dérivés de la lignée cellulaire de moelle osseuse humaine D98S, dont certains étaient HGPRT(+) et d'autres HGPRT(-). L'aminoptérine est un composé qui inhibe la synthèse de novo des purines en inhibant le DHFR. Pour qu'une cellule survive en présence d'aminoptérine, elle doit synthétiser les purines par la voie alternative de récupération. Par conséquent, lorsque des cellules sont cultivées dans un cocktail d'aminoptérine, d'hypoxanthine et de thymidine (c'est-à-dire le milieu HAT), seules les cellules HGPRT(+) sont capables de synthétiser l'ADN nécessaire à la survie ou à la prolifération de la cellule (Fig 8). Szybalski a ensuite isolé de l'ADN de cellules HGPRT(+), qu'il a utilisé pour transformer des cellules réceptrices HGPRT(-). Il a observé que les cellules ne mouraient pas en présence du milieu HAT, mais qu'elles pouvaient être sauvées(18).

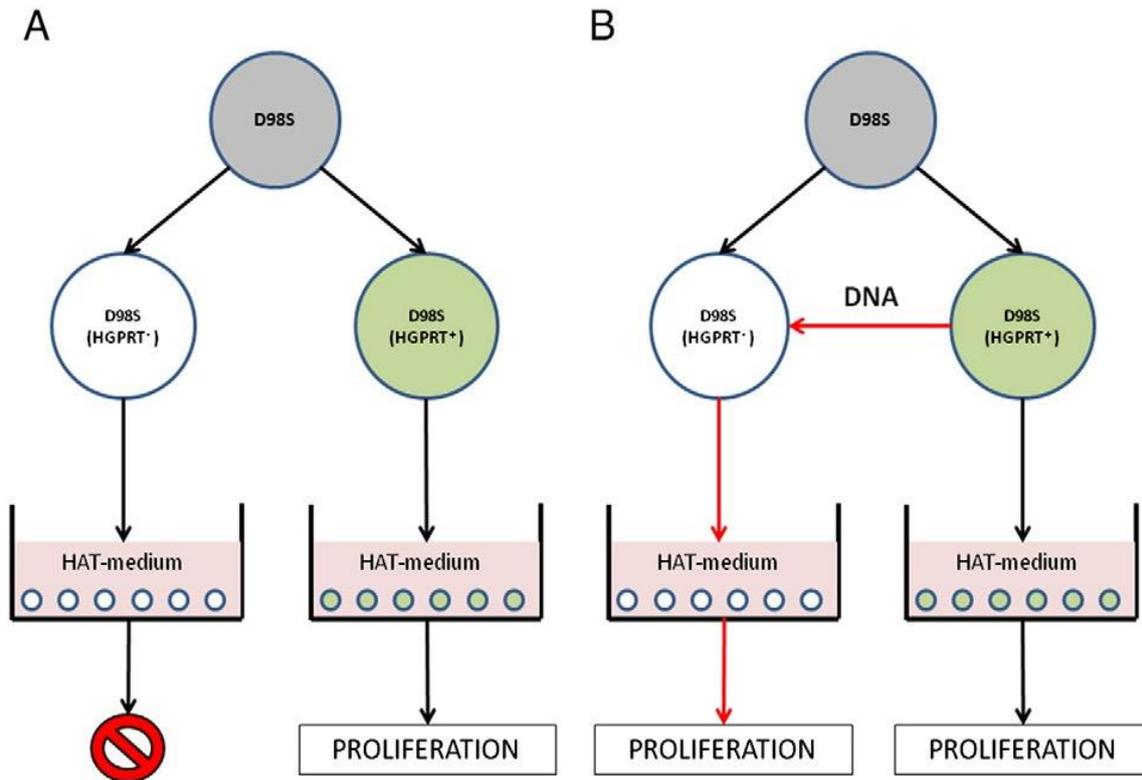


Fig. 8 : Principe de la sélection HAT. La dihydrofolate réductase (DHFR) est nécessaire à la synthèse de novo des acides nucléiques (essentielle à la synthèse de l'ADN pendant la prolifération cellulaire). L'aminoptérine, quant à elle, est un composé présent dans le milieu HAT qui inhibe la synthèse de novo des purines en inhibant la DHFR. Les purines peuvent être fournies par la voie alternative de récupération grâce à l'enzyme hypoxan-thine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Cependant, les cellules dépourvues d'activité HGPRT meurent en présence d'aminoptérine, car elles ne peuvent pas synthétiser d'ADN (A). Les cellules HGPRT(-) peuvent cependant être sauvées en isolant l'ADN des cellules HGPRT(+) et en le transférant aux cellules HGPRT(-) (B), c'est-à-dire la sélection HAT (2).

En d'autres termes, Szybalski a démontré qu'un défaut génétique pouvait être corrigé par le transfert d'un ADN fonctionnel provenant d'une autre source (étrangère). De plus, il a démontré que le gène sauvé pouvait être hérité, les cellules filles portant le même phénotype que les cellules parentales transformées. Les résultats de son étude sont devenus la première preuve documentée du transfert héréditaire de gènes dans les cellules de mammifères. Dix ans plus tard, la même méthode est devenue la clé d'une invention couronnée d'un prix Nobel décrivant la génération d'anticorps monoclonaux.

1.1.6. Premières étapes de thérapie génique :

Dix ans après la découverte initiale que les phages pouvaient transférer du matériel génétique d'une bactérie à une autre, Howard Temin a découvert que, de la même manière, des mutations génétiques spécifiques pouvaient être héritées à la suite d'une infection virale(19). Sur la base de ses observations expérimentales, il a conclu que les cellules de poulet infectées par le virus du sarcome de Rous (RSV) héritaient de manière stable des mutations génétiques spécifiques du virus qui contenaient les informations nécessaires à la génération de la descendance du RSV. Cette observation a pris une grande importance, car elle a levé le voile sur l'énigme selon laquelle l'information génétique ne pouvait circuler que de l'ADN vers l'ARN. Le virus du sarcome de Rous étant un virus à ARN, l'étude de Temin a montré que l'information pouvait également circuler de l'ARN vers l'ADN, ce qui a conduit à la découverte des ADN polymérases ARN-dépendantes. En outre, on s'est rendu compte que l'acquisition de la nouvelle caractéristique était héritée de manière stable par l'insertion chromosomique du matériel génétique étranger(20).

Il est devenu évident que les virus possédaient des propriétés qui pouvaient être très utiles pour introduire des gènes dans des cellules d'intérêt. L'accumulation de preuves de succès dans les études de transformation cellulaire a fait naître l'idée que le génie génétique pourrait devenir une nouvelle approche pour le traitement des maladies génétiques. En 1966, Edward Tatum a publié un article évoquant l'efficacité des virus à être utilisés en génétique des cellules somatiques et éventuellement en thérapie génétique(16). Bien entendu, il était également clair qu'il serait nécessaire de dépouiller ces virus de leurs gènes pathogènes et de les remplacer par un ou plusieurs gènes thérapeutiques. Malheureusement, à cette époque, les outils appropriés pour les technologies de l'ADN combinant n'étaient pas encore établis. Cependant, quelques années après l'article critique d'Edward Tatum, Rogers et al. ont démontré une première preuve de concept du transfert de gènes par l'intermédiaire de virus.

Dans cette étude, le virus de la mosaïque du tabac a été utilisé comme vecteur pour introduire un étirement polyadénylate dans l'ARN viral(21). Motivés par ces résultats, ils sont allés encore plus loin et, quelques années plus tard, ils ont réalisé le premier essai de thérapie génique directe sur l'homme. Dans cette étude, le virus du papillome de Shope de type

sauvage a été utilisé dans le but d'introduire le gène de l'arginase chez deux jeunes filles souffrant d'un trouble du cycle de l'urée(22,23). Ils pensaient que le virus du papillome de Shope codait le gène de l'activité arginase et que ce gène pouvait être transféré en introduisant le virus chez les patients. Malheureusement, le résultat de l'essai a été négatif. Il n'y a eu aucun changement dans les taux d'arginine, ni dans l'évolution clinique des miasmes hyperargininiques.

Plus tard, après le séquençage du génome du virus du papillome de Shope, il a été révélé que le génome du virus du papillome de Shope ne code en fait pas pour une arginase. En 1990, Martin Cline a été le premier à tenter une thérapie génique à l'aide d'ADN recombinant. Avant cela, Cline avait déjà réussi à titre expérimental à insérer des gènes étrangers (dihydrofolate réductase et thymidine kinase du virus de l'herpès simplex) dans des cellules souches de moelle osseuse de souris(24). En outre, il a pu démontrer que ces cellules modifiées étaient capables de repeupler partiellement la moelle osseuse d'autres souris(24). Encouragé par ces résultats, Cline a voulu tester cette approche thérapeutique chez l'homme. Il a demandé au comité des sujets humains de l'UCLA (UCLA Human Subjects committee) l'autorisation d'appliquer la même approche au traitement des patients souffrant de β -thalassémie. Cette maladie entraîne invariablement une anémie grave et potentiellement mortelle due à une déficience de la production de la partie bêta-globuline de la protéine hémoglobine (due à un défaut génétique/absence du gène de la bêta-globuline), pour laquelle le seul traitement repose sur de fréquentes transfusions sanguines. Cline a lancé l'étude et a extrait des cellules de moelle osseuse de deux patients atteints de β -thalassémie. Un patient a été traité en Italie et l'autre en Israël. Cependant, il l'a fait sans avoir reçu l'autorisation de réaliser ces études du conseil d'examen institutionnel de l'UCLA. En outre, le conseil avait des doutes évidents quant à l'efficacité de cette thérapie(25,26).

Le premier protocole clinique officiellement approuvé pour introduire un gène étranger chez l'homme a été approuvé par le Comité consultatif sur l'ADN recombinant (RAC) en décembre 1988. Dans ce protocole, aucune thérapie réelle n'a été proposée mais S.A. Rosenberg avait pour objectif d'utiliser des techniques de marquage génétique pour suivre les mouvements des cellules sanguines infiltrant les tumeurs chez les patients cancéreux(27). Sa

proposition était fondée sur des résultats antérieurs démontrant que le traitement du mélanome métastatique par des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) en même temps que le traitement par l'interleukine-2 entraînait une régression de la maladie chez certains patients(28). Dans un premier temps, Rosenberg a testé la faisabilité des TILs génétiquement modifiés en étudiant la distribution et l'éventuelle survie à long terme des TILs dans la circulation, les ganglions lymphatiques ou sur les sites tumoraux. Pour cela, il a extrait les TIL de patients atteints de mélanome métastatique et a effectué un transfert de gène rétroviral pour introduire un gène marqueur (le gène NeoR bactérien, qui entraîne une résistance à la néomycine) dans ces cellules, après quoi il les a réadministrées aux patients(29–31). L'objectif était de déterminer s'il existe une corrélation clinique entre l'infiltration des TIL et leur efficacité contre les tumeurs. Sur la base de cet essai initial, il a obtenu par la suite l'autorisation de traiter deux patients atteints d'un mélanome avancé avec des TIL modifiés ex vivo exprimant le facteur de nécrose tumorale (FNT)(29). Les résultats de cette étude ont révélé que les tumeurs ne se sont pas développées au point d'injection(31). En outre, il n'y avait aucune preuve de la présence de cellules tumorales viables lors de la résection chirurgicale de ces sites environ 3 semaines après l'injection(31).

Entre l'essai initial de Rosenberg (transduction du gène de résistance à la néomycine dans les TIL) et l'essai thérapeutique (transduction du facteur de nécrose tumorale dans les TIL), Michael R. Blaese a été le premier à réaliser un essai utilisant un gène thérapeutique(32).

Le 14 septembre 1990, la FDA a approuvé pour la première fois un essai de thérapie génique avec une tentative thérapeutique chez l'homme. Deux enfants souffrant d'un déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID), une maladie monogénétique entraînant une immunodéficience sévère, ont été traités avec des globules blancs prélevés dans le sang de ces patients et modifiés ex vivo pour exprimer le gène normal de fabrication de l'adénosine désaminase. L'un des patients, Ashanti DeSilva, a présenté une réponse temporaire, tandis que la réponse du second patient était bien moindre(32). Cependant, l'effet de la thérapie génique d'Ashanti a fait l'objet d'un débat, car elle recevait toujours simultanément une thérapie de remplacement enzymatique à base de polyéthylène glycol adénine désaminase (PEG-ADA),

qu'elle devait prendre en même temps que la thérapie génique. Un peu plus tard, l'essai ADA-SCID a également été lancé dans l'UE(33) et d'autres essais de transfert de gènes ont été lancés pour plusieurs maladies. Le premier transfert de gènes en Scandinavie a été effectué en 1995 et les premiers résultats clairs ont montré qu'un transfert de gènes efficace pouvait être réalisé dans le cerveau humain après une administration directe de gènes in vivo (34).

1.1.7. La mort de Jesse Gelsinger :

Même si les premières études n'ont pas donné les résultats escomptés, la thérapie génique a connu un véritable boom, jusqu'à la mort tragique de Jesse Gelsinger (35). En 1999, le pire scénario pour la thérapie génique est devenu réalité, lorsque Jesse Gelsinger, 18 ans, a participé à un essai clinique de thérapie génique à l'Université de Pennsylvanie à Philadelphie. Il souffrait d'une déficience partielle en ornithine transcarbamylase (OTC), une enzyme du foie nécessaire à l'élimination de l'excès d'azote des acides aminés et des protéines. Le système immunitaire de Gelsinger a réagi immédiatement après l'administration d'une très forte dose d'adénovirus et il est mort quatre jours plus tard en raison d'une défaillance d'organes (35). Ce qui est important dans ce cas, c'est qu'il est devenu le premier patient chez qui la mort pouvait être directement liée au vecteur viral utilisé pour le traitement.

1.1.8. Conclusion :

Après avoir revu les événements les plus marquants dans l'histoire de la thérapie génique, on verra dans la deuxième partie de ce premier chapitre l'histoire de découverte de la technique CRISPR-cas9.

1.2. CRISPR cas9 :

Au milieu des années 1980, lors de l'étude de la conversion isozyme de la phosphatase alcaline (PA), Y. Ishino, dans le but d'identifier la protéine responsable de la conversion isozyme de la PA dans le périplasme des cellules de E. coli K-12, a séquencé un fragment d'ADN de E. coli de 1,7 kbp couvrant la région contenant le gène iap (isozyme de la phosphatase alcaline) (36). L'isozyme de l'AP a été détecté précédemment par des analyses biochimiques et génétiques (37). Pendant le séquençage du fragment d'ADN contenant iap, une personne de l'équipe s'est rendu compte que la même séquence apparaissait plusieurs fois

dans différents clones. De plus, il était difficile de lire avec précision les séquences répétées en utilisant le fragment de Klenow à 37°C, en raison de la terminaison non spécifique des réactions d'incorporation de didésoxynucléotides pour l'ADN matrice, en raison de la formation d'une structure secondaire par la séquence palindromique. C'est pourquoi il a fallu plusieurs mois pour lire précisément la séquence de la région CRISPR en 1987(36). Une séquence répétée particulière a été détectée en aval du codon de terminaison de la traduction pour le gène *iap* (Fig 9).

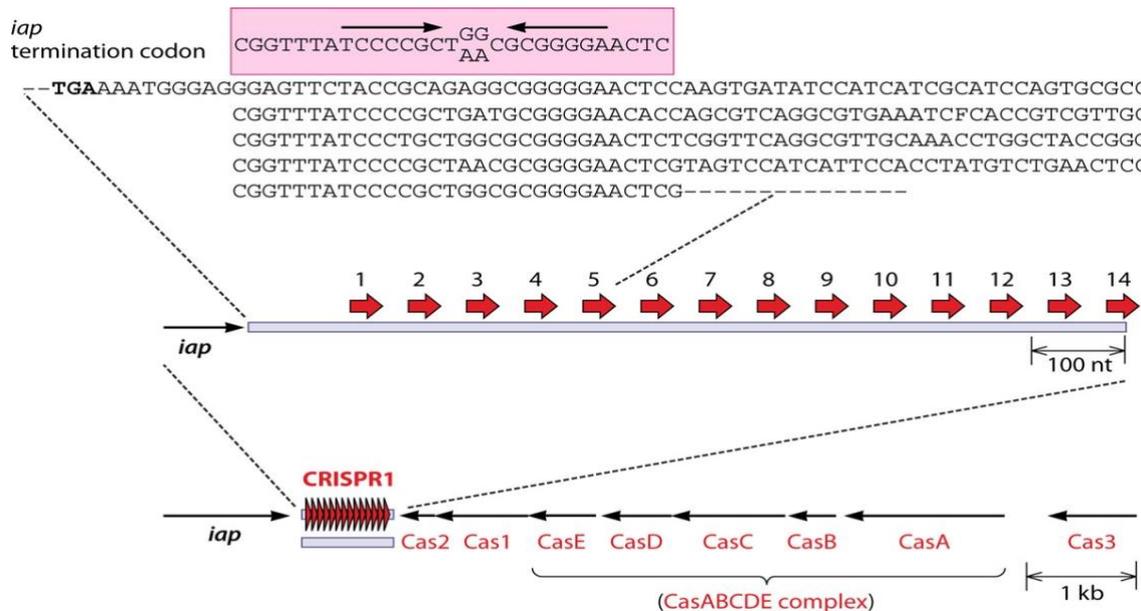


Fig. 9 : Le premier CRISPR trouvé dans *E. coli*. Suite à l'analyse du gène *iap* de *E. coli*, une séquence répétitive très ordonnée a été trouvée en aval du gène *iap*. L'unité de séquence conservée a été répétée 5 fois avec une longueur constante d'espaces en 1987. Il s'avère que la répétition a eu lieu 14 fois au total par l'analyse ultérieure du génome. Le groupe de gènes *cas* a également été identifié dans la région en aval. nt, nucléotides(38).

Il est remarquable que la même région puisse être séquencée en seulement 1 jour en utilisant la technologie actuelle par amplification de la région cible par PCR directement à partir du génome, suivie d'un marquage fluorescent et d'un séquençage cyclique à 72°C. La caractéristique de la séquence répétitive était si mystérieuse et inattendue qu'elle est mentionnée dans la discussion, même si sa fonction n'a pas été comprise(36). Notamment, la même séquence contenant une symétrie de dyade de 14 pb était répétée cinq fois avec une séquence variable de 32 nucléotides intercalée entre les répétitions (Fig. 9). Des séquences nucléotidiques bien conservées contenant une symétrie de dyade, nommées séquences

palindromiques extragéniques répétitives (REP)(39), avaient été trouvés précédemment dans *E. coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et ont été suggérés pour stabiliser l'ARNm(38). Cependant, aucune similitude n'a été trouvée entre les séquences REP et les séquences répétées détectées en aval du gène *iap*. En fait, cette séquence était, à l'époque, unique dans les bases de données de séquences. Comme il s'est avéré par la suite, il s'agissait de la première rencontre avec une séquence CRISPR. Peu après, des séquences similaires ont été détectées par analyse d'hybridation par transfert de Southern dans d'autres souches d'*E. coli* (C600 et Ymel) et dans deux autres membres des Enterobacteriaceae, *Shigella dysenteriae* et *S. enterica* serovar Typhimurium (phylum Proteobacteria)(40). Par la suite, des séquences répétées similaires ont également été trouvées chez des membres du phylum Actinobacteria, comme *Mycobacterium tuberculosis*(41), mais pas dans la souche étroitement apparentée *Mycobacterium leprae*, ce qui a conduit à l'utilisation de ces séquences répétées hautement polymorphes pour le typage des souches(42).

1.2.1. Découverte de CRISPR chez les archées :

Une avancée majeure a été réalisée lorsque des séquences répétées similaires ont été identifiées par Mojica et ses collègues dans l'archée *Haloferax mediterranei* au cours des recherches sur les mécanismes de régulation permettant aux archées extrêmement halophiles de s'adapter aux environnements très salins(43). La transcription des régions génomiques contenant les séquences répétées a été démontrée par la méthode Northern blot(43), mais ce n'est que plus récemment que des preuves irréfutables de la transformation des transcrits en plusieurs produits d'ARN différents ont été apportées(44).

Dans cette étude, les auteurs ont d'abord suggéré que ces séquences répétées pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, en facilitant peut-être le processus de conversion de l'ADN double brin de la forme B à Z pour la liaison spécifique d'une protéine régulatrice. Il a en effet souvent été suggéré à l'époque que la forte teneur en GC des génomes halophiles pouvait faciliter une telle transition de B à Z à des fins de régulation à la forte concentration de sel intracellulaire caractéristique des haloarchaea. Cependant, une telle explication ne pouvait pas être valable pour les bactéries. Peu après, les mêmes auteurs ont trouvé une séquence répétée similaire chez *Haloferax volcanii* et ont émis l'hypothèse que ces séquences répétées pourraient être impliquées dans la partition des réplicons(45).

Ensuite, les séquences répétées inhabituelles entrecoupées de séquences non conservées, détectées pour la première fois chez *E. coli* et *H. mediterranei*, ont été identifiées dans un nombre croissant de génomes bactériens et archéens et ont été décrites sous différents noms par différents auteurs, tels que les courtes répétitions régulièrement espacées (SRSR) (43), les répétitions directes entrecoupées d'espaces (SPIDR) et les grands groupes de répétitions en tandem (LCTR)(46).

Mojica et al. ont été les premiers à réaliser que toutes ces séquences bactériennes et archéales étaient fonctionnellement liées. Le terme CRISPR a été proposé par Jansen et al. en 2002 (47) et est devenu généralement accepté par la communauté travaillant sur ces séquences, ce qui a évité toute confusion supplémentaire causée par les nombreux noms différents pour les séquences répétées apparentées. Des études de génomique comparative ont mis en lumière les caractéristiques communes des CRISPR, à savoir que :

- Elles sont situées dans des régions intergéniques,
- Ils contiennent de multiples répétitions directes courtes avec une très faible variation de séquence,
- Les répétitions sont entrecoupées de séquences non conservées,
- Et une séquence leader commune de plusieurs centaines de paires de bases est située d'un côté du groupe de répétitions.

Le fait que ces séquences mystérieuses soient conservées dans deux domaines différents de la vie indique un rôle plus général de ces séquences. Les séquences CRISPR ont été trouvées dans presque tous les génomes archéens et dans environ la moitié des génomes bactériens, ce qui en fait la famille de séquences répétées la plus largement distribuée chez les procaryotes. À ce jour, aucune séquence CRISPR n'a été trouvée dans un génome eucaryote.

1.2.2. Identification des gènes Cas

L'accumulation de séquences génomiques au début de ce siècle a permis aux scientifiques de comparer le contexte génomique des régions CRISPR dans de nombreux organismes, ce qui a conduit à la découverte de quatre gènes conservés régulièrement présents à côté des régions CRISPR. Ces gènes ont été désignés comme les gènes associés à CRISPR (

CRISPR-associated) 1 à 4 (cas1 à cas4) (47). Aucune similarité avec les domaines fonctionnels d'une protéine connue n'a été identifiée pour Cas1 et Cas2. En revanche, Cas3 contenait les sept motifs caractéristiques des hélicases de la superfamille 2, tandis que Cas4 s'est avéré être apparenté aux exonucléases RecB, qui font partie du complexe RecBCD pour la résection terminale des cassures double-brin afin de lancer la recombinaison homologue. Par conséquent, Cas3 et Cas4 ont été prédits comme étant impliqués dans le métabolisme de l'ADN, y compris la réparation et la recombinaison de l'ADN, la régulation transcriptionnelle et la ségrégation chromosomique. En raison de leur association avec les CRISPR, il a été suggéré que les protéines Cas sont impliquées dans la genèse des loci CRISPR (47).

1.2.3. Découverte de la fonction CRISPR

Il a été d'abord suggéré que la fonction d'un CRISPR pouvait être liée à l'adaptation des organismes aux températures élevées, d'après les recherches faites sur les archées. Cependant, avec la disponibilité d'un nombre croissant de séquences, il s'est avéré que cette corrélation n'était pas robuste et que de nombreux organismes mésophiles contenaient également des séquences CRISPR.

Ce n'est que lorsque le moment Eureka est venu quand Francisco Mojica, à Alicante, et Christine Pourcel, à Orsay, ont remarqué que les régions intercalaires entre les séquences répétées étaient homologues à des séquences de bactériophages, de prophages et de plasmides(48)(49). Ils ont notamment souligné que les phages et les plasmides n'infectent pas les souches hôtes hébergeant les séquences homologues de l'espaceur dans le CRISPR. A partir de ces observations, ils ont proposé indépendamment que les séquences CRISPR fonctionnent dans le cadre d'un système de défense biologique similaire au système RNAi* eucaryote pour protéger les cellules de l'entrée de ces éléments génétiques mobiles étrangers. Les deux groupes ont également suggéré que les CRISPR peuvent en quelque sorte déclencher la capture de morceaux d'ADN étranger envahissant pour constituer une mémoire des agressions génétiques passées (48,49).

Il est important de noter que le système CRISPR-Cas, avec sa composante mémoire, ressemble plutôt au système immunitaire adaptatif des vertébrés, la différence cruciale étant que le système immunitaire animal n'est pas héréditaire. Compte tenu de la diversité des

systèmes CRISPR-Cas, de leur distribution erratique suggérant une grande mobilité et de leur omniprésence chez les archées, Makarova et al. ont suggéré que le système CRISPR-Cas est apparu chez un ancien ancêtre des archées et s'est propagé horizontalement aux bactéries. Ils ont conclu sur une note pratique, suggérant que les systèmes CRISPR-Cas pourraient être exploités pour réduire au silence les gènes dans les organismes codant pour les protéines Cas (50).

La fonction du système CRISPR-Cas en tant que système immunitaire acquis procaryote a finalement été prouvée expérimentalement en 200, en utilisant la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus* (51). L'insertion de la séquence du phage dans la région espaceur du CRISPR de *S. thermophilus* a rendu cette souche résistante au phage correspondant. En revanche, cette résistance bactérienne à l'infection par le phage a disparu lorsque la séquence protospacer correspondante a été supprimée du génome du phage. En outre, il a été démontré expérimentalement que CRISPR-Cas restreint la transformation des plasmides portant des séquences correspondant aux espaceurs CRISPR(52). Par la suite, le système CRISPR-Cas de *S. thermophilus* exprimé dans *E. coli* a montré une protection hétérologue contre la transformation de plasmides et l'infection par des phages par le système CRISPR-Cas9 reconstitué de *S. thermophilus*(53). Ce travail a également montré que cas9 est, dans ce cas, le seul gène cas nécessaire à l'interférence encodée par CRISPR. Peu après, il a été prouvé que le complexe Cas9-ARN CRISPR (crRNA) purifié est capable de cliver l'ADN cible *in vitro* (54,55)Le système CRISPR-Cas de *Streptococcus pyogenes* a ensuite été appliqué pour réaliser une édition du génome dans des cellules nerveuses humaines et des cellules rénales de souris (56,57). C'est ainsi que CRISPR-Cas est devenu largement connu comme le système d'immunité acquise procaryote (51,58). Les différentes étapes qui sous-tendent le fonctionnement de ce système sont présentées à la figure 10.

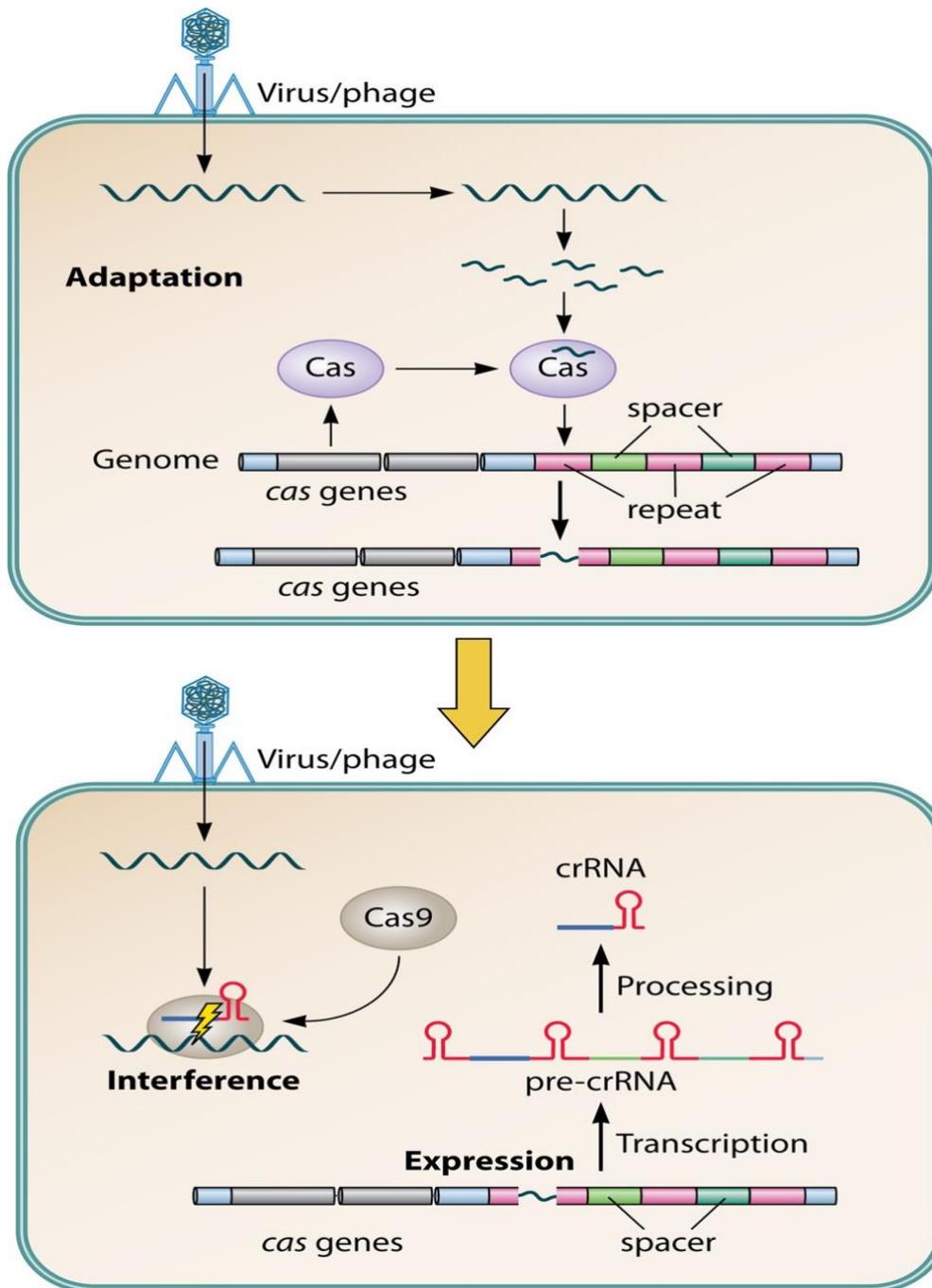


Fig. 10 : Processus d'acquisition du système immunitaire par CRISPR-Cas. (Haut) Adaptation. L'ADN envahissant est reconnu par les protéines Cas, fragmenté et incorporé dans la région espaceur de CRISPR, et stocké dans le génome. Expression (en bas). Le pré-ARNr est généré par la transcription de la région CRISPR et est transformé en unités d'ARN plus petites, appelées ARNr. Interférence (en bas). En profitant de l'homologie de la séquence espaceur présente dans l'ARNr, l'ADN étranger est capturé, et un complexe avec la protéine Cas ayant une activité nucléase clive l'ADN(38).

1.2.4. Popularité explosive du terme CRISPR

En 2008, l'équipe de Eugene Koonin du National Center for Biotechnology Information à Bethesda, Maryland, a pu démontrer pour la première fois le fonctionnement du mécanisme CRISPR/Cas9 en tant que système immunitaire adaptatif : chaque fois qu'une bactérie est confrontée à un phage, celle-ci copie et incorpore ses segments d'ADN dans son propre génome comme "espaceurs" entre les courtes répétitions d'ADN dans le CRISPR. Les segments dans les 'espaceurs' fournissent un modèle pour les molécules d'ARN de la bactérie pour reconnaître tout ADN futur d'un virus entrant et aider à guider l'enzyme Cas9 pour le découper de manière à désactiver le virus(59)

Ce n'est qu'en 2012, lorsqu'une petite équipe de scientifiques dirigée par Jennifer Doudna, University of California Berkeley, et Emmanuelle Charpentier, University of Umea, a publié un article expliquant comment exploiter le système CRISPR-Cas9 en tant qu'outil pour couper n'importe quel brin d'ADN dans un tube à essai(55).

Jennifer Doudna qualifierait plus tard la technologie de démocratique :

« Elle ouvre les portes du génie génétique à n'importe quelle personne qui possède des compétences de base en biologie moléculaire et qui souhaite éditer le génome ».

Après le succès de leur publication, Emmanuelle Charpentier pris ensuite deux décisions. La première fut en accord avec son ambition originale d'appliquer son travail à des fins médicales, elle cofonda une entreprise afin d'exploiter leur méthodologie dans le domaine de la thérapie génique. CRISPR Therapeutics, basée à Cambridge aux Etats-Unis et Bâle en Suisse naquit donc en novembre 2013. Sa seconde décision fut d'obtenir un poste permanent doté d'un important support institutionnel ; elle s'installa alors au Helmholtz Centre for Infection Research à Hannover où elle occupa un poste de directrice d'un département et d'enseignante à la faculté de médecine.

Jennifer Doudna déposa via UC Berkeley une demande de brevet le 25 Mai 2012 encadrant l'utilisation du duo Cas9-sgARN à des fins de modification génétique. Cette demande créditaient Emmanuelle Charpentier, Martin Jinek, Krzysztof Chylinski et elle-même comme inventeurs. Cela peut souvent prendre des années pour qu'un nouvel outil ne soit

adopté en biotechnologie. Mais avant même la fin de l'année 2012, au moins six travaux portant sur différents usages de la technique CRISPR Cas9 furent soumis pour publication. L'un d'eux allait déclencher l'une des plus grandes batailles entre scientifiques de notre siècle(60).

Nombreuses sont les équipes qui avaient soumis des brevets concernant la technique d'édition génomique qui dérivait des CRISPR. Au fur et à mesure des publications, les applications qui pouvaient en découler apparaissaient de plus en plus extraordinaires. L'intérêt commercial et lucratif allait de pair. Les demandes de brevet déposées par Siksnys (61), Sontheimer & Marrafini et Kim(62) avaient été refusées par l'USPTO (*United States Patent and Trademarks Office*) car elles ne parvenaient pas à « *décrire le caractère inventif* ».

Deux demandes de brevets pouvaient se voir attribuer l'invention de techniques d'édition génomique basée sur l'utilisation de la Cas9 et son guide ARN. La première avait été déposée en Mai 2012 par Jennifer Doudna, *UC Berkeley* et l'Université de Vienne(63), la seconde en Décembre 2013 par Feng Zhang et le *Broad Institut*(64). À la surprise générale c'est celle déposée par Feng Zhang à qui un brevet fut attribué en Avril 2014, déclenchant une agressive bataille entre équipes juridiques qui continue encore plus de 2 ans après l'attribution(65).

Les disputes entre institutions académiques au sujet de brevet ne sont pas rares, mais un tel niveau de rancœur et de médiatisation est inédit. Souvent ces institutions parviennent à une entente, mais dans ce cas les intérêts commerciaux et la liste des industriels licenciés derrière chacune des compagnies, cotées en bourse, dont les équipes rivales font parties des comités scientifiques laisse peu d'espoir au compromis.

Au début de l'année 2013 plusieurs écrits annonçaient la déferlante de publications à venir. Les applications : l'utilisation de la technique pour éditer des cellules souches humaines ou encore la modification d'un organisme entier (le poisson tigre ou zebrafish) (66). Cette même année le nombre de recherches Google pour le terme CRISPR décolla, et encore aujourd'hui l'intérêt médiatique ne cesse de croître. L'intérêt scientifique et commercial alla de pair, avec en tête de file les potentielles applications thérapeutiques chez l'homme et l'utilisation dans le domaine de l'agriculture commerciale. Dans ces deux cas cela soulèvera de nombreuses préoccupations et réflexions éthiques.

Fin 2014, des équipes scientifiques avaient, entre autres, utilisé la technique CRISPR-Cas9 pour augmenter la résistance du blé aux insectes ou encore reproduire des effets carcinogènes ou corriger des mutations chez la souris adulte(67–69). Les pionniers des CRISPRs continuèrent d'explorer le potentiel de la technique, mais ils n'étaient plus seuls, de nombreux scientifiques à travers le monde les avaient rejoints. Ce système immunitaire microbien dont l'homme ne soupçonnait pas l'existence s'était révélé en quelques années un outil exceptionnel pour les scientifiques.

L'Office européen des brevets délivre un brevet européen sur Crispr/Cas9 au Broad Institute dès 2015 tandis que Berkeley obtient le sien en 2017. Les deux brevets ont fait l'objet de procédures d'oppositions et le brevet détenu par le Broad Institute en Europe est révoqué en 2018 pour défaut de nouveauté.

Début 2020, l'appel fait par le Broad Institute contre cette décision est rejeté tandis que la validité du brevet de Berkeley est confirmée. Pas encore de point final en Europe car des recours contre ces deux décisions ont été déposés mais pour le moment la situation est plutôt en faveur des chercheuses de Berkeley.

Si le juge étasunien a considéré que les deux brevets pouvaient coexister car ils ne portaient pas sur la même chose, l'OEB n'a manifestement pas le même avis. Les brevets ont des revendications similaires et seul l'inventeur, identifié ici comme étant les chercheuses de Berkeley, peut obtenir un brevet.

Pour faire bonne figure, dans une communication du 16 janvier 2020, le Broad Institute appelle « toutes les institutions à aller au-delà des litiges et à travailler ensemble pour assurer un accès large et ouvert à cette technologie transformatrice ». Il rappelle néanmoins que la révocation de ce brevet n'a pas de conséquences sur la validité de la majorité du reste de son large portefeuille de brevets européens sur les techniques Crispr, qui comprend également de nombreux brevets sur Crispr/Cas9(70).

TECHNIQUES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

2. TECHNIQUES DE LA THERAPIE GENIQUE :

Nous avons vu dans la partie précédente intitulée « Historique » la définition de la thérapie génique. D'un point de vue plus opérationnel, la thérapie génique consiste en l'administration d'acides nucléiques destinés à traiter une pathologie. Ici nous nous intéresserons à la thérapie génique in-vivo, c'est-à-dire à l'administration d'acides nucléiques directement chez l'homme. Elle s'oppose à la thérapie génique ex vivo qui consiste à modifier le patrimoine génétique d'une cellule ex-vivo pour ensuite réadministrer les cellules modifiées chez l'homme. Évidemment certaines techniques peuvent s'appliquer in vivo et ex vivo.

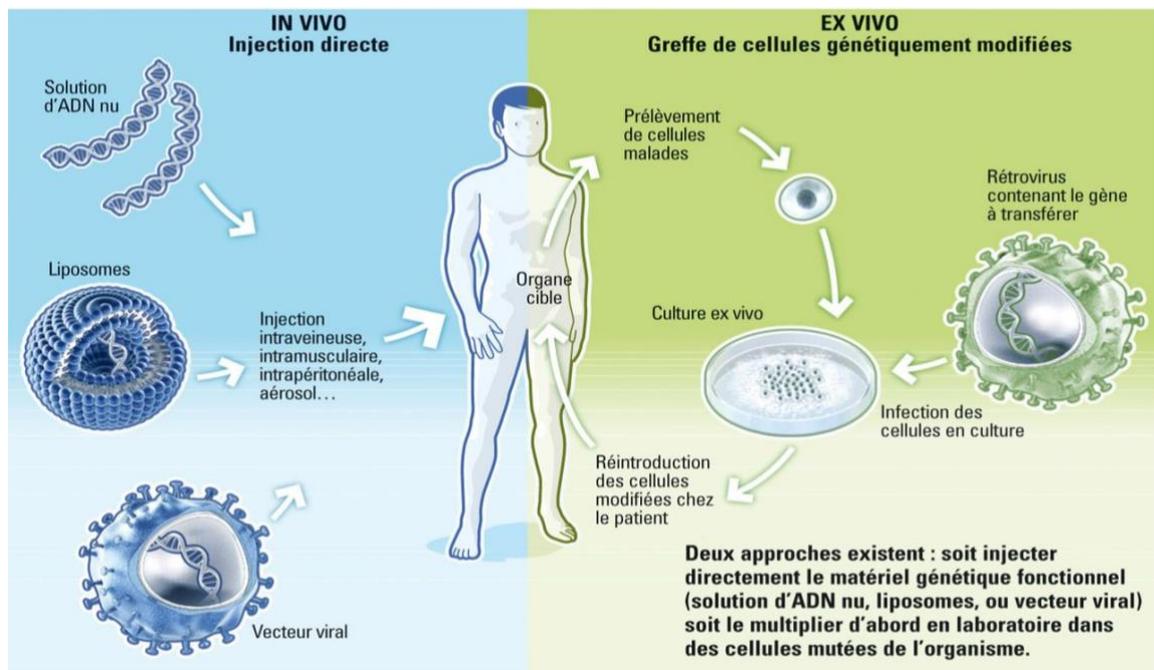


Fig. 11 : Les deux voies de la thérapie génique(71)

Les thérapies géniques selon qu'elles soient in vivo ou ex vivo, entraînent des difficultés différentes. Nous étudierons principalement les difficultés au développement de la thérapie génique in vivo, la ex vivo sera peu abordée.

Il s'agit de techniques finalement complémentaires et selon la volonté thérapeutique, l'une ou l'autre sera plus intéressante, selon la pathologie traitée, le choix de la stratégie sera différent.

Naturellement quand on parle de thérapie génique, nous pensons directement au fait de transférer un gène manquant chez les patients. En effet, c'est une utilisation importante et la première à avoir été développée, il existe cependant de nombreuses autres technologies.

Enfin la dernière possibilité est de modifier la structure du gène. Il s'agit de l'édition du génome ou « gene editing » en anglais. Cette dernière possibilité a ouvert la voie à de nombreux traitements et au développement de technologies de rupture notamment CRISPR/Cas 9.

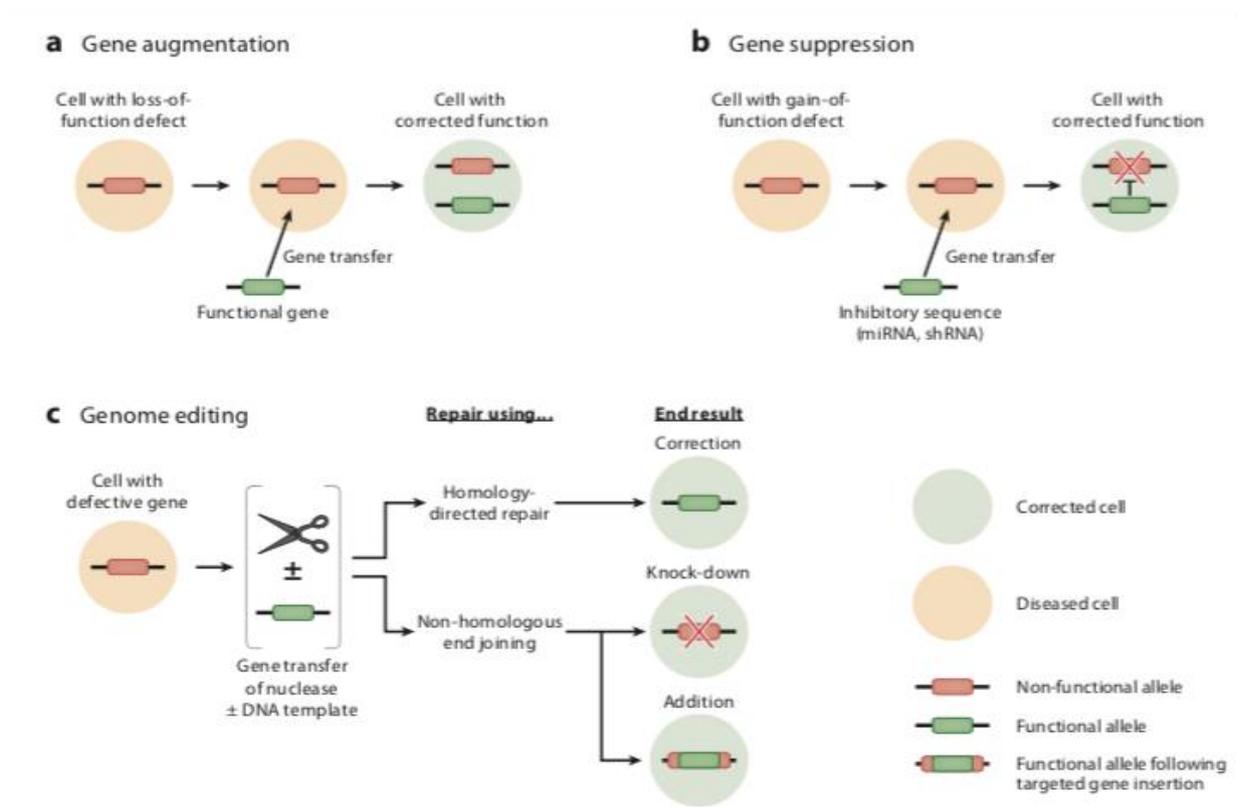


Fig. 12 : Les différentes applications de la thérapie génique(72)

2.1. Gene silencing:

Gene silencing ou l'extinction de gènes est définie comme une modification épigénétique de l'expression génétique conduisant à l'inactivation de gènes précédemment actifs. La modification épigénétique n'altère pas la séquence d'ADN et, bien qu'elle soit héréditaire, des fréquences variables de retour à l'expression sont observées.

Cette stratégie utilise les oligonucléotides pour inhiber l'expression de certains gènes :

- Les ARN antisens
- Les ARN interférents

Ces oligonucléotides sont constitués d'une courte chaîne d'acides nucléiques et ils vont cibler les ARNm et les pré-ARNm des gènes d'intérêt pour moduler leur expression en protéines.

Bien qu'ils utilisent une technique similaire, ces deux types d'oligonucléotides ont des mécanismes d'action différents. La principale différence est que les ARN antisens n'existent pas à l'état naturel alors que les ARN interférents existent chez les végétaux et les animaux. C'est en étudiant ces mécanismes que les scientifiques ont imaginé des applications thérapeutiques.

2.1.1. Les ARN antisens

Les ARN antisens agissent en inhibant la traduction de l'ARN messager contre lequel ils sont dirigés. L'ARN antisens doit être complémentaire de l'ARNm cible et se lie de manière complémentaire à ce dernier(73).

En effet, les ARN sont constitués de 4 types de bases : l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et l'uracile (U). Ces bases se lient de manière complémentaire entre elles :

- a. - L'Adénine avec l'Uracile
- b. - la Guanine avec la Cytosine

Dans le cas de la molécule d'ADN, la Thymine remplace l'Uracile. Les oligonucléotides se basent sur ces caractéristiques pour se lier de manière spécifique à un

ARNm. L'ARN est appelé antisens car il reconnaît spécifiquement un ARNm sens. Les bases composant l'ARN antisens se lient de manière complémentaire avec les bases de la molécule d'ARNm cible.

Concrètement, l'association entre l'ARN antisens et l'ARNm sens forme un ARN double brin. Cet ARN double brin est reconnu par une enzyme responsable de sa dégradation, la RNase H. Les thérapies antisens sont donc conçues pour rechercher, lier et détruire un ARNm de manière très spécifique, de sorte que la quantité de protéines causant la maladie diminue considérablement (73).

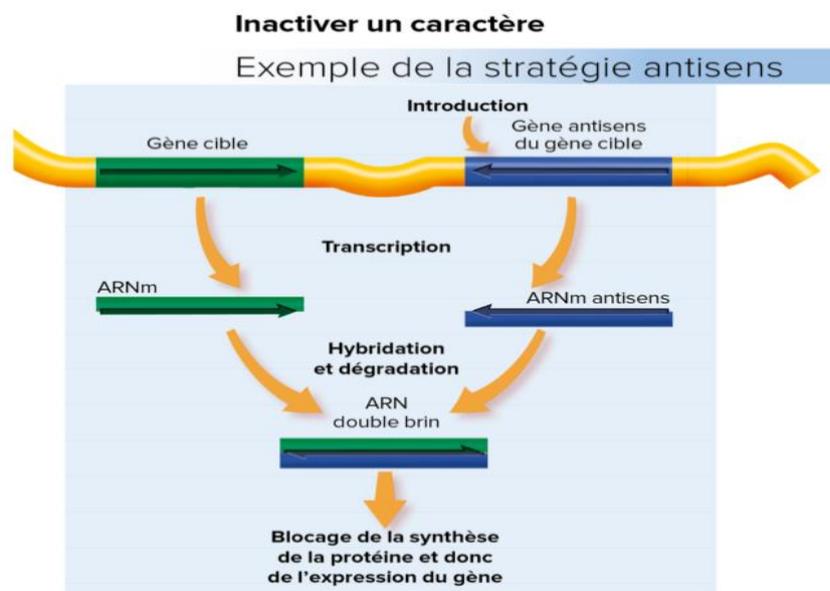


Fig. 13 : Mécanisme d'action d'un ARN antisens(74)

Les ARN antisens peuvent également passer la membrane nucléaire et se fixer sur la molécule d'ADN. La molécule d'ADN est double brin. En se fixant dessus, l'ADN va former une triple hélice. Cette conformation va inhiber la transcription en ARNm et donc par suite la traduction en protéine.

La taille de l'ARN antisens est critique car elle doit être suffisamment longue pour avoir une séquence de base unique et donc se fixer de manière spécifique. L'ARN ne doit cependant pas être trop grand pour garder sa capacité à passer les membranes cytoplasmiques et nucléaires(75).

2.1.2. Les ARN interférents :

Plusieurs classes de petits ARN non codants peuvent reconnaître plus ou moins spécifiquement des ARN messagers. Ces petits ARN regroupés sous le vocable « interférents » (ARNi) sont des ARN qui interagissent avec les ARN messagers pour bloquer la traduction et la synthèse des protéines correspondantes. Ils existent naturellement dans la cellule (codés par l'ADN) pour contrôler l'expression de gènes dits actifs(73).

Le ARNi est un ARN de petite taille qui s'hybride avec un ARN messager cellulaire, précurseur d'une protéine ciblée. Dans la cellule, un complexe de plusieurs protéines RISC (pour RNAi Induced Silencing Complex) prend en charge l'ARN interférent et « scanne » les différents ARNm présents dans la cellule. Si le complexe RISC/ARNi reconnaît un ARNm (par homologie), la protéine RISC coupe l'ARNm qui est dégradé. La protéine correspondante n'est alors pas synthétisée.

Il existe deux grands types d'ARN interférents :

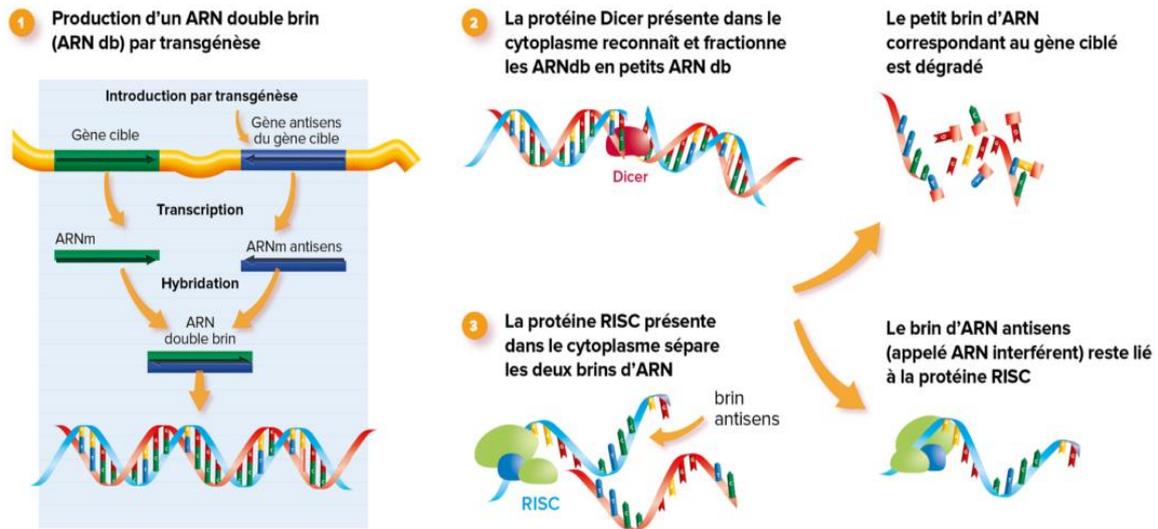
- Les small interfering RNA (siRNA)
- Les microRNAs (miRNA)

Les scientifiques sont en mesure d'utiliser la technologie ARNi dans les cellules de mammifères parce qu'elles expriment une machinerie hautement organisée qui sert de médiateur à un processus endogène de silençage génique posttranscriptionnel, connu sous le nom de voie des microARN (miRNA) Les miRNA sont générés par la transcription de gènes non codants dans les cellules de mammifères, subissant un traitement enzymatique de la transcription dans le noyau avant d'être activement transportés vers le cytoplasme par l'exportine 5. Dans le cytoplasme, ils subissent un traitement supplémentaire pour être convertis en miRNA matures. Les miRNA reconnaissent leur ARNm cible, déclenchant l'assemblage du RISC (complexe de silençage induit par l'ARN) et conduisant généralement à une répression translationnelle. Les voies du miRNA et de l'ARNi suivent un processus similaire, mais avec quelques différences. Par exemple, les miRNA diffèrent structurellement des siRNA, et s'associent généralement aux régions non traduites de l'ARNm cible par un appariement imparfait des bases et n'interviennent pas dans le clivage de l'ARNm. En

revanche, les siRNA exogènes s'apparient généralement aux régions codantes de la cible par un appariement parfait et dirigent le clivage enzymatique de la cible. Néanmoins, les deux aboutissent finalement à une diminution de la synthèse d'une protéine spécifique(76).

ETAPE N°1

Production de l'ARN interférent spécifique du gène à inactiver



ETAPE N°2

Inactivation du gène cible par l'ARN interférent

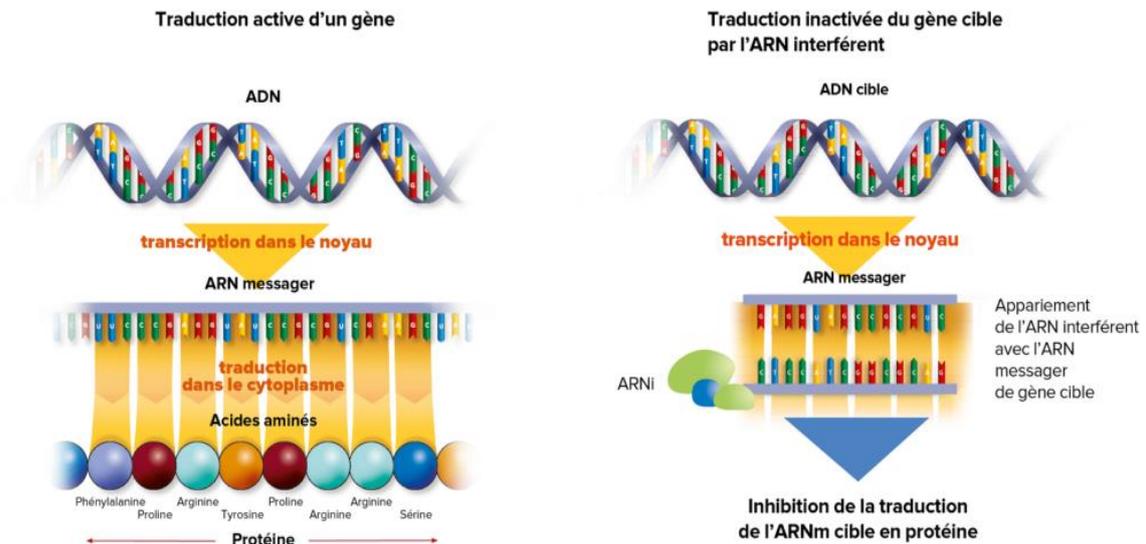


Fig. 14 : Principe de l'inactivation d'un gène par ARN interférent (ARNi)(77)

En résumé, bien que le miRNA (micro ARN) et le siRNA (petit ARN interférent) soient tous deux des petites molécules d'ARN impliquées dans l'interférence ARN et qu'ils fonctionnent selon des mécanismes similaires, il existe certaines différences entre ces deux molécules qu'on pourra résumer sous forme de tableau.

Origine	Le siRNA est un ARN double brin exogène absorbé par les cellules, tandis que le miRNA est simple brin et provient d'un ARN non codant endogène. En outre, le siRNA est présent chez les animaux inférieurs et les plantes, mais pas chez les mammifères, alors que les miRNA sont présents chez tous les animaux et les plantes.
Structure	Le siRNA est un duplex d'ARN de 21 à 23 nucléotides avec un surplomb dinucléotide 3', tandis que le miRNA est une épingle à cheveux d'ARN de 19 à 25 nucléotides qui forme un duplex en se liant l'un à l'autre.
Cible	Le siRNA est hautement spécifique d'une seule cible ARNm, tandis que le miRNA peut inhiber la traduction de plusieurs cibles ARNm en raison de son imperfection d'appariement.

Tableau 2 : Résumant les principales différences entre le miRNA et le siRNA(78)

2.2. Transfert d'acides nucléiques in vivo :

Il s'agit de l'application la plus ancienne de thérapie génique, en s'appuyant sur l'utilisation de vecteurs, l'acide nucléique souhaité est ainsi administré in vivo. La principale particularité de ce type de traitement c'est qu'on ne modifie pas le génome et à ce titre il présente moins de risques. Cependant, le problème majeur des ARNm est la délivrance ; du fait qu'ils soient des molécules de large poids moléculaire et présentant un problème lors du passage à travers la membrane cellulaire en plus du problème de dégradation par les nucléases. Mais les avancées actuelles dans les systèmes de délivrance permettent d'être plus optimistes dans leurs potentiels thérapeutiques surtout dans le domaine de la cancérologie.

2.2.1. Ajout d'une protéine fonctionnelle :

Deux cas possibles : soit que le patient ait un gène codant pour une molécule fonctionnelle manquante, soit qu'elle est défectueuse(79).

C'est le cas dans le traitement de maladies monogéniques, un gène spécifique est muté, il en résulte soit une absence de protéine, soit une protéine défectueuse, le transfert de gène va

permettre l'apport du gène codant pour la molécule d'intérêt.

Exemple de la mucoviscidose :

Dans la mucoviscidose le gène défaillant est responsable de la production de la protéine régulatrice de la conductance transmembranaire : la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), la morbidité étant essentiellement liée aux complications pulmonaires, la première cible thérapeutique est l'épithélium pulmonaire dont les anomalies électrophysiologiques disparaissent lorsque le gène CFTR est transféré au moyen d'un vecteur ici utilisé est l'adénovirus recombinant (dont le gène E1 est délété)(80).

2.2.2. Utilisation de gène suicide :

La thérapie génique par suicide ciblé est une idée qui a suscité beaucoup d'intérêt pour le traitement du cancer. Dans la littérature, cette approche est également connue sous le nom de thérapie enzymatique par prodrogue dirigée par gène (GDEPT). Elle nous permet de combiner des stratégies de ciblage passif, actif et transcriptionnel pour maximiser l'activité anticancéreuse au niveau de la tumeur tout en minimisant l'impact sur les tissus normaux. Par définition, la thérapie GDEPT est un processus en deux étapes où les cellules cancéreuses sont d'abord transduites par un gène codant pour une enzyme non toxique (gène suicide), suivi de l'administration d'une prodrogue non toxique (81). La mort cellulaire survient à la suite de la conversion de la prodrogue en son métabolite toxique par les cellules transduites qui expriment activement le gène suicide. Dans le contexte du GDEPT, l'index thérapeutique augmente en réduisant les effets secondaires et en limitant la toxicité d'un agent de chimiothérapie aux seules cellules cancéreuses ciblées. Cette approche présente deux avantages distincts par rapport aux stratégies classiques de traitement du cancer, telles que la chimiothérapie et la radiothérapie.(82)

2.3. Virus Oncolytique :

La virothérapie oncolytique est une approche thérapeutique qui utilise des virus compétents en matière de réplication pour tuer les cancers. Les virus oncolytiques sont micro-organismes pouvant se répliquer qui ont été sélectionnés ou modifiés pour se développer à l'intérieur des cellules tumorales(83). Les virus oncolytiques tirent parti de mutations, de

voies de signalisation ou d'antigènes spécifiques aux tumeurs, ce qui permet leur réplique sélective dans les cellules tumorales entraînant ainsi leur lyse. Par exemple, l'activation de la transcription virale sous une région régulatrice du gène qui est préférentiellement transcrite dans les tumeurs cibles est couramment utilisée pour obtenir la spécificité tumorale.

Les virus qui ont été examinés pour leur cytotoxicité et leur efficacité dans ce genre de thérapie sont l'adénovirus, le virus de la rougeole, les rétrovirus, le virus de la maladie de Newcastle(84), le virus de l'herpès simplex et le virus de la stomatite vésiculaire, tous ces virus se répliquent préférentiellement dans les tumeurs, mais l'un des défis de la thérapie virale oncolytique est la pénétration tumorale des virus. La matrice extracellulaire et le tissu fibreux associé à la tumeur entravent la propagation des virus libérés par les tumeurs infectées. La coexpression d'enzymes qui détruisent la matrice extracellulaire, comme l'héparanase, a été utilisée avec succès dans des études précliniques pour surmonter la résistance du tissu fibreux, qui empêche la pénétration des virus oncolytiques(85).

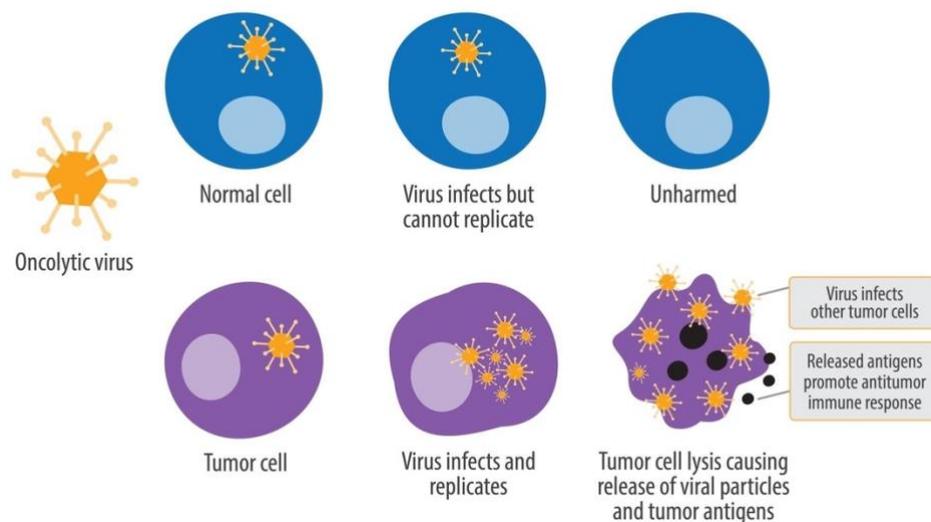


Fig. 15 : Mécanisme d'action des virus oncolytiques(86)

2.4. La technique des CAR T cell :

Il s'agit d'une technologie récente mais qui pourrait avoir un impact important sur le monde de la santé. A l'origine, l'utilisation des CAR T est prévue pour l'ex-vivo.

Le principe consiste en la modification génétique des lymphocytes T du patient en procédant par faire exprimer à ces cellules un récepteur antigénique chimérique, ou « Chimeric Antigen Receptor » CAR. Celui-ci permet la reconnaissance de manière spécifique un antigène exprimé par les cellules cancéreuses généralement le CD19(87). Il joue le rôle d'un détecteur à cellules oncogènes.

La Food and Drug Administration (FDA) américaine a approuvé la première immunothérapie cellulaire, la thérapie cellulaire à récepteur d'antigène chimérique (CAR)-T, pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B réfractaire en 2017, et la seconde pour le traitement du lymphome non hodgkinien à cellules B en 2018(88).

En outre, la thérapie CAR-T a encore du chemin à faire en tant que thérapie pour les tumeurs solides. Tous ces défis soulignent la nécessité de rechercher d'autres options d'immunothérapie, et les développements récents ont montré que la thérapie par cellules tueuses naturelles (NK) est l'une des plus prometteuses.

Les cellules NK sont un type de cellules lymphoïdes essentielles au système immunitaire inné. Elles reconnaissent les cellules "non-soi" sans avoir recours aux anticorps et au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), exécutant ainsi une réaction immunitaire rapide. Leur large cytotoxicité et leur rapidité de destruction font des cellules NK un outil idéal pour l'immunothérapie du cancer.

Les cellules CAR-NK présentent plusieurs avantages par rapport aux cellules CAR-T. Premièrement, contrairement aux cellules CAR-T, les cellules CAR-NK conservent une capacité intrinsèque à reconnaître et à cibler les cellules tumorales par l'intermédiaire de leurs récepteurs natifs, ce qui rend moins probable la fuite des cellules tumorales par la régulation négative de l'antigène cible CAR. Deuxièmement, les cellules CAR-NK ne subissent pas d'expansion clonale ni de rejet immunitaire en quelques jours ou semaines, et ne présentent donc pas les mêmes problèmes de sécurité, tels que le syndrome de libération de cytokines, observés dans de nombreux essais cliniques CAR-T. Enfin, les cellules NK ne nécessitent pas une correspondance HLA stricte et ne risquent pas de provoquer la maladie du greffon contre l'hôte, un risque important imposé par l'immunothérapie par cellules CAR-T, ce qui permet aux cellules CAR-NK d'être une thérapie allogénique prête à l'emploi(88).

2.5. Gene editing in vivo :

L'édition du génome consiste en l'insertion, la délétion ou le remplacement d'un ou plusieurs brins d'ADN à l'aide de techniques de génie génétique. Pour cela, sont utilisées des protéines particulières capables de cliver le génome que sont les nucléases également appelées enzymes de restriction ou ciseaux moléculaires. L'enjeu de ces outils est de cliver spécifiquement un endroit du double brin d'ADN afin de permettre un mécanisme de réparation de la cellule mais également la recombinaison avec d'autres brins. Des mécanismes au sein même de la cellule permettent donc l'autoréparation de la molécule d'ADN, mais également la possibilité d'une réorganisation des gènes du brin.

Les deux mécanismes alors engagés sont donc : la recombinaison homologue (HDR), où les séquences d'ADN sont échangées entre molécule d'ADN identiques, et un mécanisme non-conservatif qu'est la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) qui conduit à la création de nouvelles séquences différentes de la séquence initiale, ce mécanisme par son mode de fonctionnement est donc sujet à créer des mutations (89).

2.5.1. Outils de clivage / Techniques :

2.5.1.1. Zinc-Finger Nucleases

Les nucléases à doigts de zinc est la classe de réactifs de ciblage qui s'est avérée la plus polyvalente et la plus efficace dans les années précédentes car ils possèdent des domaines distincts de liaison à l'ADN et de clivage de l'ADN (figure 13). Ces protéines synthétiques sont nées de l'observation de Chandrasegaran selon laquelle l'enzyme de restriction naturelle de type IIS, FokI (*Flavobacterium okeanoikoites* endonuclease I), possède des activités de liaison et de clivage physiquement séparables.

Le domaine de clivage n'a aucune spécificité de séquence apparente, et Chandrasegaran a montré que le clivage pouvait être redirigé en substituant des domaines de reconnaissance alternatifs au domaine naturel ((90)(91)(92)). Le plus utile d'entre eux était un ensemble de doigts de zinc (ZFs) Cys2His2 dans lequel chaque unité de ~30 acides aminés liait un seul atome de zinc. La structure cristalline d'un ensemble de trois doigts liés à l'ADN a montré que chaque doigt contacte principalement 3 pb d'ADN de façon remarquablement modulaire(93). Ceci suggère que de nombreuses séquences différentes pourraient être attaquées en réalisant de nouveaux assemblages de ZFs.

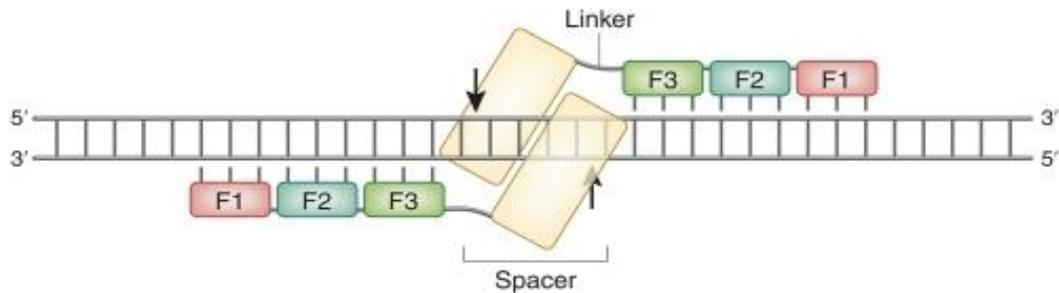


Fig. 16 : Illustration d'une paire de ZFNs liés à l'ADN. Les doigts de zinc sont représentés par des boîtes ouvertes, avec de courtes lignes verticales indiquant les principaux contacts avec les paires de bases de l'ADN. Les domaines de clivage FokI sont représentés par des cases ombragées, avec des sites de clivage communs, espacés de 4 à 5 cm.

Bien que cela n'ait pas été reconnu initialement, le domaine de clivage FokI doit se dimériser pour couper l'ADN (94,95). L'interface du dimère est faible, et la meilleure façon de réaliser le clivage est de construire deux ensembles de doigts dirigés vers des séquences voisines et de les joindre chacun à un domaine de clivage monomère. Lorsque les deux ensembles de doigts se lient à leurs séquences de reconnaissance, une concentration locale élevée facilite la dimérisation et le clivage. Plusieurs études ont montré que la configuration optimale utilise un lieu court entre les domaines de la protéine et un espaceur de 5 ou 6 pb (7 peut également fonctionner) entre les sites de liaison qui se trouvent en orientation inversée.

L'exigence de la dimérisation est un grand avantage pour cette raison : comme un monomère n'est pas actif, le clivage ne se produit pas sur des sites de liaison uniques. Le réactif de clivage n'est assemblé à la cible que si les doigts ont une spécificité adéquate, et l'exigence combinée de lier deux protéines amène la spécificité globale dans une gamme très utile ; par exemple, deux protéines à trois doigts spécifient l'emplacement de 18 pb, ce qui est suffisant, en principe, pour choisir une cible unique, même dans un génome complexe.

Les ZFN ont été conçues, construites et utilisées avec succès pour des gènes individuels dans une grande variété d'organismes et de types de cellules.

2.5.1.2. TALEN :

Après près de deux décennies de travaux pionniers sur les ZFN, une plate-forme programmable de liaison à l'ADN de deuxième génération a été mise au point à partir de facteurs de liaison à l'ADN identifiés dans la bactérie phytopathogène *Xanthomonas* (96). Les TALEN (transcription activator-like effector nuclease) sont des enzymes de restrictions capables de couper un brin d'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Ce sont des protéines

chimériques, constituées d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine endonucléasique. Elles vont induire une cassure double-brin d'ADN en un site spécifique du génome. La réparation de la cassure peut alors s'accompagner de mutations. De cette façon, les TALEN peuvent être utilisées pour cibler des mutations au niveau de sites choisis du génome(97)

Les TALEN combinent les propriétés de liaison à l'ADN des TALE (transcription activator-like effector) et de clivage de l'ADN par l'endonucléase FokI (Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I).

La région centrale des TALE est composée d'un nombre variable de répétitions. Chaque répétition est constituée de 34 acides aminés et se lie à un nucléotide cible unique. Les TALE s'associent alors à l'ADN en formant une hélice qui s'enroule autour de l'ADN où chaque répétition reconnaît un nucléotide de la séquence cible.

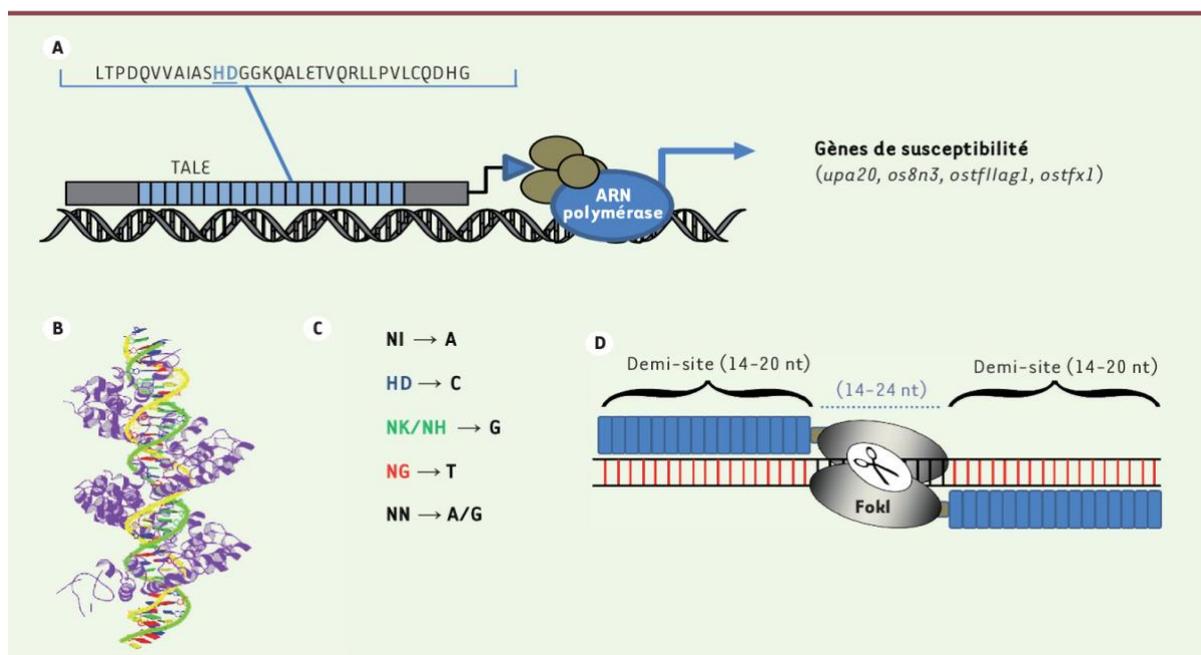


Fig. 17 : Organisation des TALE et TALEN. **A.** Les TALE (transcription activator-like effector) sont des facteurs de transcription produits par les bactéries pathogènes du genre *Xanthomonas*. Injectés dans les plantes par le système de sécrétion de type III, ils sont importés dans le noyau, se lient aux boîtes UTP et activent les gènes de susceptibilité, tels *upa20*, *os8n3*, *ostfIIag1* ou *ostfx1* de la plante hôte. Les TALE sont constitués de répétition d'un motif de 34 acides aminés. Au sein de ces répétitions, les acides aminés 12 et 13 (en bleu) reconnaissent un nucléotide spécifique. **B.** Les TALE se lient à leurs cibles en formant une hélice qui s'enroule autour de l'ADN. Chaque répétition du TALE reconnaît un nucléotide adjacent. **C.** Il existe un code de reconnaissance précis entre les acides aminés 12-13 et les nucléotides cibles : N, Asp ; I, Ile ; H, His ; D, Asp ; K, Lys. **D.** Association d'une paire de TALEN et structure de son

site d'ADN cible. Nt : nucléotide(97).

La synthèse de cette protéine particulière résulte de l'assemblage des oligonucléotides réalisé après deux étapes de PCR suivies d'une amplification de tout le gène. Une fois l'assemblage des gènes codant pour le TALEN effectué, ils sont insérés dans une structure mobile capable de transférer du matériel génétique à une cellule qu'est un plasmide. Une fois dans cette dernière, l'ADN sera traduit et les TALEN seront donc capables de réaliser une cassure double brin de l'ADN. Suivant cette action, la cellule va entreprendre des mécanismes de réparation notamment par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ), c'est à dire par reconnexion des deux extrémités provoquée par la cassure lorsqu'aucune séquence complémentaire n'est disponible pour la synthèse de la réparation. Ce type de mécanisme est donc le siège de potentielles mutations liées à une insertion ou une délétion, ce qui implique donc la nécessité d'une réflexion lors de la création du TALEN et la vérification par PCR, suite à la formation d'un hétéroduplex, des potentielles différences entre deux allèles.

Basé sur ce principe, les TALEN peuvent permettre de réaliser l'insertion d'un génome étranger dans une cellule hôte à partir de l'introduction d'ADN étranger au niveau du site de la cassure qui sera utilisé comme modèle par les mécanismes de réparations intrinsèques.

Néanmoins, cette technique a quelques limites notamment liées au fait d'un manque de spécificité au niveau des sites de reconnaissance ce qui entraîne des clivages non voulus pouvant également conduire à la mort de la cellule si ces derniers entraînent des réarrangements chromosomiques majeurs.

2.5.1.3. Méganucléases :

Certains archaea, bactéries, phages, champignons unicellulaires, levures et algues produisent des enzymes cytotoxiques également appelés endodésoxyribonucléases qui vont avoir la capacité de reconnaître des séquences d'ADN double-brin de grande taille (12 à 40 paires de bases) qui sont donc très souvent uniques dans le génome, ce qui rend donc l'action de ces enzymes spécifiques.

Il existe principalement deux familles d'endonucléases de homing (89), les endonucléases introniques et les intéines. Ces endonucléases ont donc cette fonction de ciseaux moléculaires de l'ADN, ils sont capables de remplacer, supprimer ou modifier une séquence de façon spécifique, mais afin de modifier la séquence ciblée par cette enzyme il est

possible de modifier le site de reconnaissance par génie génétique.

Ces ciseaux moléculaires sont codés par des introns ou des intéines (portion non codante d'un gène) qui sont mobiles dans le génome mais sont intégratifs à des endroits précis du génome qui permet de casser l'allèle complémentaire (qui ne contient pas cette partie mobile) à l'aide de la méganucléase exprimée (Figure 14). Pour certains introns et les intéines, la cassure induite permet la duplication de la partie mobile grâce à un mécanisme de recombinaison homologue de l'ADN double brin. Ceci permet donc l'intégration éventuelle d'une séquence déterminée.

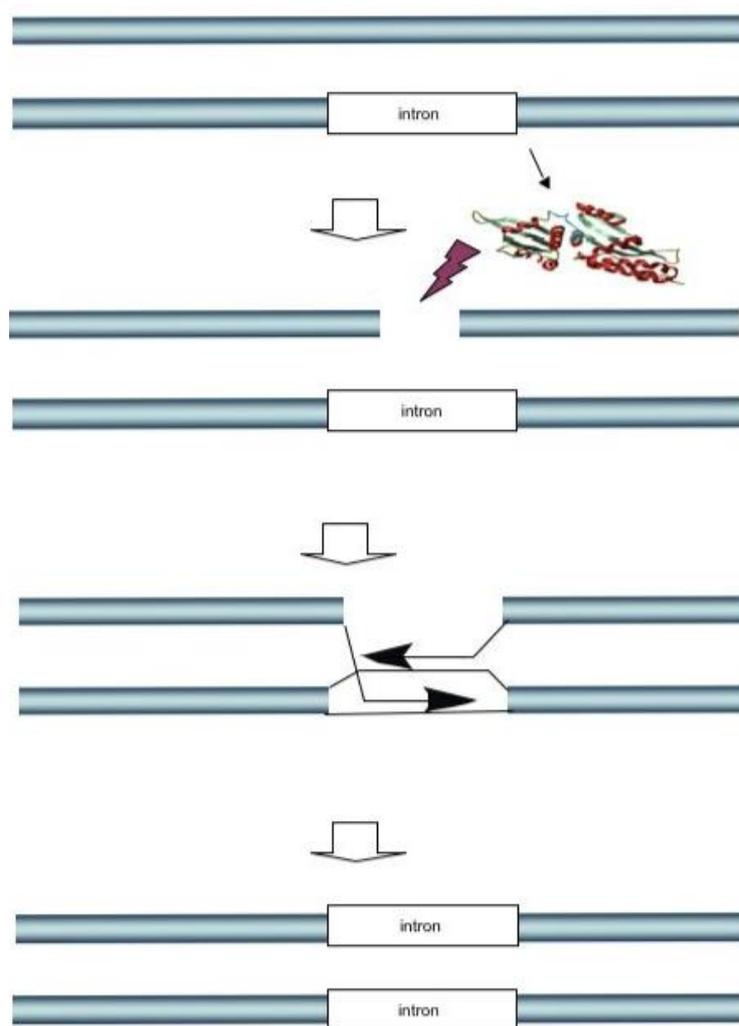


Fig. 18 : Mécanisme de fonctionnement des méganucléases de homing(89)

Arrivant ainsi à l'outil le plus récent, le système CRISPR-cas9 qu'on discutera en

détails dans la partie suivante.

CRISPR CAS 9 : RÉÉCRIRE NOTRE HISTOIRE

3. CRISPR CAS 9 : REECRIRE NOTRE HISTOIRE

Le système CRISPR-Cas est devenu synonyme d'édition du génome dans le monde d'aujourd'hui en raison de son mécanisme simpliste, hautement spécifique, efficace et bien adapté à l'édition de gènes à haut débit et multiplexé pour une variété de types de cellules et d'organismes. Les chercheurs connaissent peut-être bien les deux principaux composants de CRISPR, l'ARN guide et la nucléase associée à CRISPR, mais mener des expériences CRISPR n'est pas anodin.

3.1. Mécanisme

Dans cette partie on discutera le mécanisme de ciblage du génome médié par CRISPR-cas9.

Comme a été discuté préalablement, CRISPR-Cas est un système immunitaire adaptatif microbien qui utilise des nucléases guidées par l'ARN pour couper des éléments génétiques étrangers. Six types (I-VI) (98) de systèmes CRISPR ont été identifiés dans un large éventail d'hôtes bactériens et archéens, dans lesquels chaque système comprend un groupe de gènes associés à CRISPR (Cas), des ARN non codants et un réseau distinctif d'éléments répétitifs (répétitions directes). Ces répétitions sont entrecoupées de courtes séquences variables dérivées de cibles d'ADN exogènes, appelées protospacers, et constituent ensemble le réseau d'ARN CRISPR (crRNA). Au sein de la cible ADN, chaque protospacer est toujours associé à un motif adjacent au protospacer (PAM), qui peut varier en fonction du système CRISPR spécifique.(99)

Le système CRISPR de type II est l'un des mieux caractérisés (100). Il se compose de la nucléase Cas9, de la matrice du crRNA qui code les ARN guides et d'un crRNA auxiliaire trans-activateur « trans-activating CRISPR RNA » (tracrRNA) qui facilite le traitement de la matrice du crRNA en unités distinctes (101). Chaque unité crRNA contient ensuite une séquence guide de 20 nt et une répétition directe partielle, la première dirigeant Cas9 vers une cible ADN de 20 pb par le biais d'un appariement de bases Watson-Crick (Fig. 19).

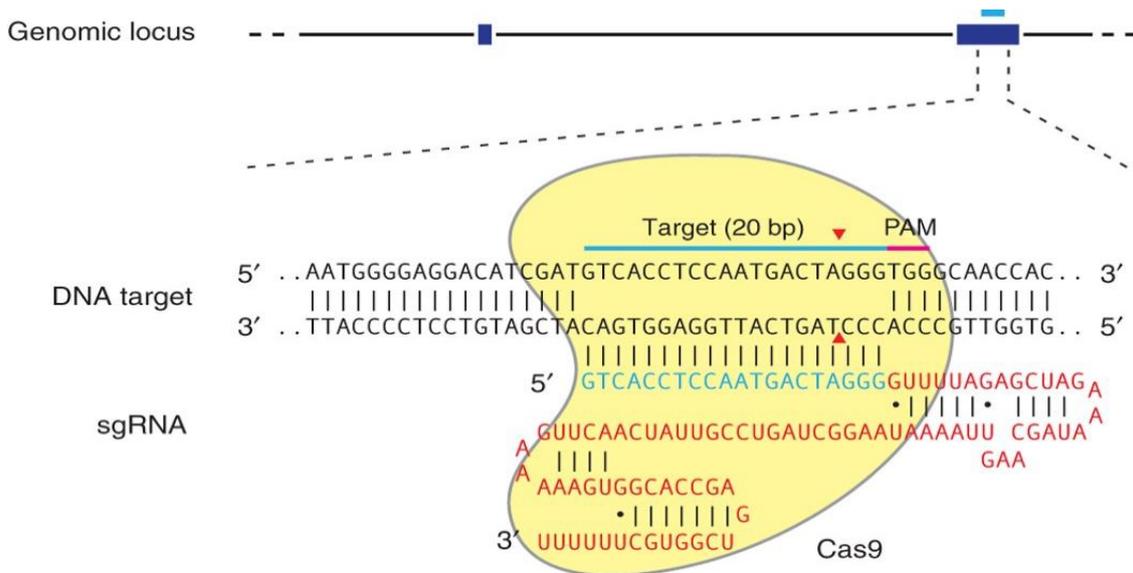


Fig. 19 : La nucléase Cas9 de *S. pyogenes* (en jaune) est ciblée sur l'ADN génomique (le locus EMX1 humain est illustré à titre d'exemple) par un ARNg composé d'une séquence guide de 20 nt (bleu) et d'un échafaudage (rouge). La séquence guide s'apparie avec la cible ADN (barre bleue sur le brin supérieur), directement en amont d'un motif adjacent 5'-NGG requis (PAM ; rose). Cas9 crée un DSB ~3 pb en amont du PAM (triangle rouge) (102).

Dans le système CRISPR-Cas dérivé de *Streptococcus pyogenes*, l'ADN cible doit immédiatement précéder un 5'-NGG PAM (63), alors que d'autres orthologues de Cas9 peuvent avoir des exigences différentes en matière de PAM, comme ceux de *S. thermophilus* (5'-NNAGAA(56,101) pour CRISPR1 et 5'-NGGNG (53,54) pour CRISPR3) et de *Neisseria meningitidis* (5'-NNNNGATT)(103).

La fonction nucléase guidée par l'ARN de CRISPR-Cas est reconstituée dans les cellules de mammifères par l'expression hétérologue de Cas9 humain optimisé au niveau du codon et des composants ARN requis. En outre, le crRNA et le tracrRNA peuvent être fusionnés pour créer un ARN chimérique à guide unique (sgRNA) (55) (Fig.19). Cas9 peut ainsi être redirigé vers presque n'importe quelle cible d'intérêt à proximité immédiate de la séquence PAM en modifiant la séquence guide de 20 nt dans le sgRNA.

Compte tenu de sa facilité de mise en œuvre et de sa capacité de multiplexage, Cas9 a été utilisé pour générer des cellules eucaryotes modifiées portant des mutations spécifiques via NHEJ et HDR. L'injection directe de sgRNA et de mRNA codant Cas9 dans des embryons

a permis la génération rapide de souris transgéniques avec de multiples allèles modifiés(104). Ces résultats à l'époque ont été extrêmement prometteurs pour l'édition d'organismes qui sont autrement génétiquement intraitables.

Les nucléases Cas9 effectuent un clivage spécifique du brin en utilisant les domaines nucléasiques conservés HNH : target strand et RuvC : nontarget strand, qui peuvent être mutés et exploités pour une fonction supplémentaire(53). Une mutation de l'aspartate à l'alanine (D10A) dans le domaine catalytique de RuvC permet au mutant de la nickase de Cas9 (Cas9n) de couper plutôt que de cliver l'ADN pour produire des cassures simple brin, et la réparation préférentielle subséquente par HDR peut potentiellement diminuer la fréquence des mutations indel non désirées provenant des DSB (Double Stranded Breaks) hors cible. Des paires d'ARNg décalées de manière appropriée peuvent guider Cas9n pour qu'il entaille simultanément les deux brins du locus cible afin de provoquer une DSB, augmentant ainsi efficacement la spécificité de la reconnaissance de la cible.

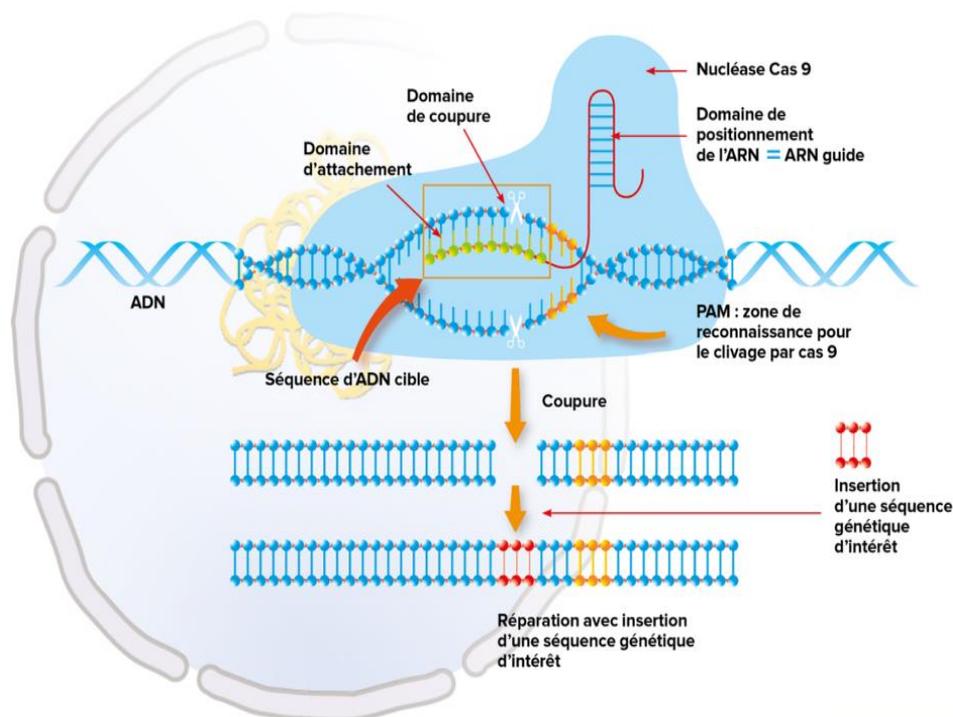


Fig. 20 : Retouche génomique par le système Crispr-cas9(105)

3.2. Rôle des mécanismes de réparation de l'ADN dans l'édition génomique :

La formation d'une coupure double brin par les endonucléases ZFNs, TALENs ou le système CRISPR/Cas9, est le point de départ pour parvenir à une modification ciblée dans le génome. Différents mécanismes moléculaires vont intervenir pour réparer ces lésions à l'ADN, dont la réparation non-homologue par jonction des extrémités (Non- Homologous End Joining, NHEJ) et la réparation dirigée par homologie (Homology Directed Repair, HDR) qui sont les deux processus majoritairement sollicités (Figure 21).

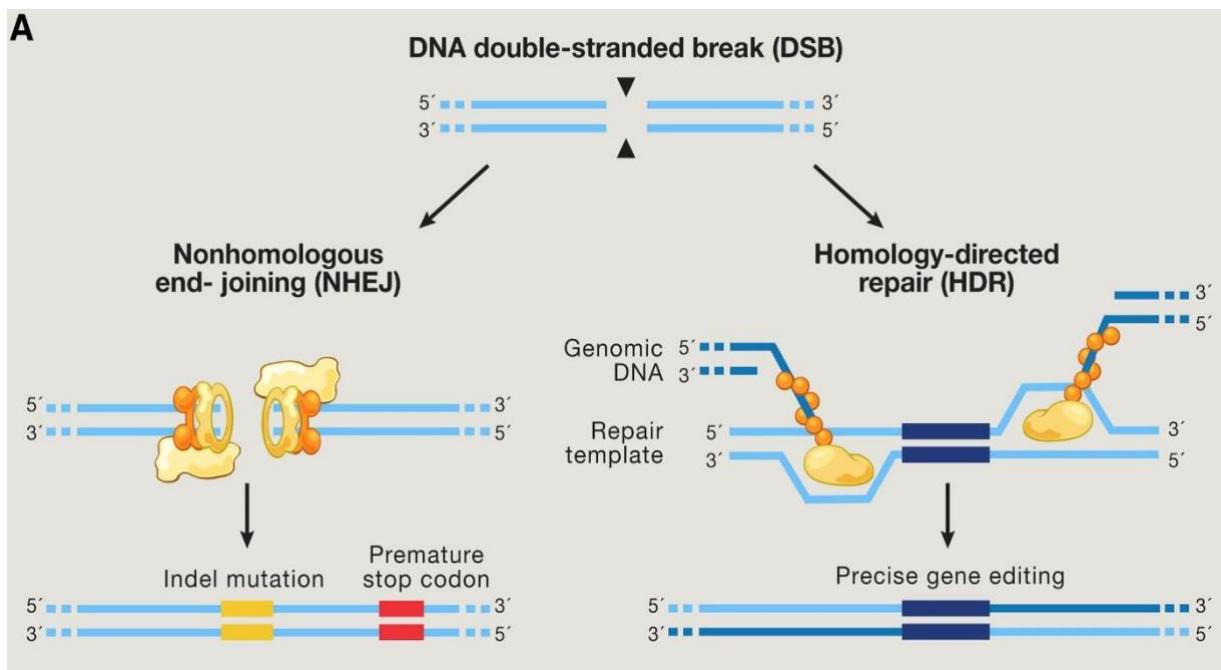


Fig. 21 : Voies de réparation de l'ADN induite par une coupure double brin(66).

La réparation par NHEJ ou par HDR sont les deux principaux mécanismes moléculaires employés par la cellule pour réparer une coupure double brin dans l'ADN. Dans la voie de réparation par NHEJ, un hétérodimère Ku se lie aux extrémités formées par la DSB. Cet appariement permet le recrutement d'autres protéines associées dans la réparation et permet de joindre les extrémités d'ADN incluant notamment la DNA Ligase IV. Des INDELS

peuvent alors se former au site de jonction et induire un décalage du cadre de lecture ce qui rend le gène non fonctionnel. Dans la voie de réparation par HDR, des protéines Rad51 se fixent sur les extrémités d'ADN formées par la DSB. S'en suit le recrutement de cofacteurs, comme BRCA1, impliqués dans la recombinaison à partir d'un ADN donneur (chromatine sœur, ou ADN exogène) qui présente des bras d'homologie de part et d'autre de la coupure. Lorsque l'ADN donneur est exogène, il permet d'introduire des modifications spécifiques dans le génome. (66)

3.2.1. Réparation dirigée par homologie

La réparation par HDR permet de rétablir la séquence d'ADN d'origine en copiant celle-ci à partir de la séquence d'ADN de la chromatine sœur. Il est possible de substituer le rôle de cette chromatine sœur en co-livrando un ADN donneur synthétique contenant des bras d'homologie avec la région d'intérêt à modifier. Lorsqu'une endonucléase fera une coupure dans cette région, la réparation par HDR pourra solliciter l'ADN donneur et permettre l'insertion de changements spécifiques à ce locus, que ce soit la substitution d'un ou plusieurs nucléotides, voire l'insertion d'un nouveau fragment d'ADN. Le recours à cette stratégie est notamment intéressant pour substituer de façon précise des mutations non-sens ou faux sens afin de rétablir un codon normal ou non-pathologique. Cependant, ce mécanisme n'est sollicité que dans des cellules en prolifération au cours des phases S et G2 (106). Cette caractéristique rend donc difficile le développement d'une thérapie systémique où les cellules du patient demeurent essentiellement dans un état quiescent. De façon alternative, il semblerait que la formation d'un nick plutôt que d'une DSB permette d'augmenter l'efficacité de HDR dans les cellules en stade S/G2(107).

3.2.2. Réparation non-homologue par jonction des extrémités

La réparation par NHEJ est le principal mécanisme de réparation de l'ADN dans le cas d'une coupure double brin. Ce processus est notamment majoritaire en dehors des phases S et G2 du cycle cellulaire durant lesquelles la présence de la chromatine sœur pour une réparation par HDR est moins probable(106). Lors de la jonction des extrémités d'ADN, la réparation par NHEJ peut insérer des erreurs au site de coupure sous la forme de micro-insertions ou micro-délétions de nucléotides ; ces modifications portent le nom de INDELS. Ainsi,

l'utilisation d'endonucléases programmables permet d'induire la formation d'INDELS pouvant déphaser/rétablir le cadre de lecture d'un gène ou encore de muter le site de liaison d'un facteur de transcription sur un promoteur(108,109). De façon intéressante, cette voie de réparation permet aussi de générer des délétions dans l'ADN génomique lorsque 2 locus d'un même gène sont ciblés simultanément (108).

3.2.3. Comparaison entre HDR et NHEJ :

La voie de réparation NHEJ sujette aux erreurs, est souvent la voie de choix lors de l'utilisation de CRISPR/Cas9 pour générer un knockout génétique. Malgré la grande efficacité de la création de mutations indel, cette voie présente des inconvénients. Les délétions sont souvent in-frame, ce qui peut donner lieu à des protéines semi-fonctionnelles. Les indels peuvent facilement s'étendre de 1 à 200 pb, sans aucun contrôle sur leur longueur exacte ou leur emplacement (en amont/en aval), ce qui peut faire de l'identification et de la validation des indels une tâche coûteuse et longue(110).

La voie de la réparation par homologie (HDR) permet une édition précise du génome en incluant un modèle de réparation dans le processus. L'utilisation d'un modèle monocaténaire garantit que ce modèle n'est pas inséré de manière aléatoire ailleurs dans le génome ou qu'il n'est pas ciblé par l'enzyme Cas9. La séquence introduite permet également une validation rapide et efficace par PCR des clones édités avant le séquençage. Nous avons effectué une analyse comparative des deux mécanismes de réparation afin de déterminer si la voie HDR est une bonne alternative à la voie NHEJ pour la génération à haute fréquence de knockouts génétiques dans les cellules souches embryonnaires (ESC) de souris C57BL/6NCrl, mais avec l'avantage concomitant d'une édition précise du génome(110).

MOYENS D'ACHEMINEMENT DU SYSTÈME CRISPR CAS9

4. MOYENS D'ACHEMINEMENT DU SYSTEME CRISPR CAS9 :

Dans la thérapie génique classique par transfert de gène, l'objectif est de livrer dans le tissu à traiter une copie normale d'un gène pour compenser pour un gène défectueux et d'en permettre une expression maintenue à long terme. Il est donc impératif que ce matériel doit être livré efficacement dans le tissu cible que ce soit sous la forme d'ADN, d'ARN ou d'une protéine. CRISPR-Cas9 est une biotechnologie qui nécessite à la fois un système d'expression de Cas9, les mRNA et les sgRNAs, mais également la protéine Cas9 en elle-même.

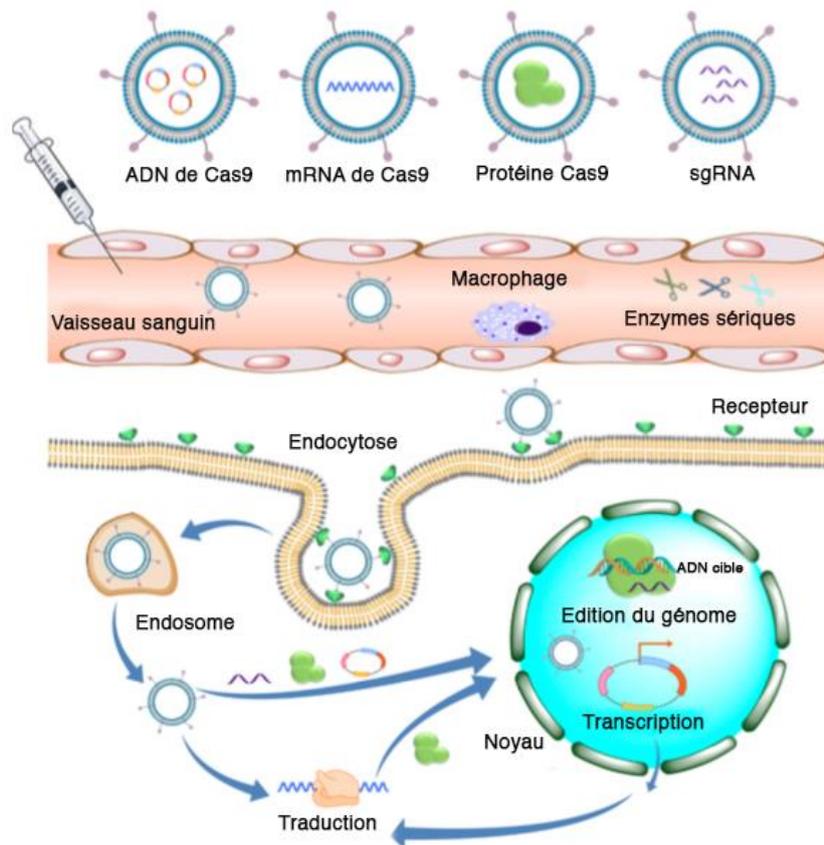


Fig. 22 : Différents challenges a surmonter pour le transfert des éléments de Cas9/gRNA (111)

Dans cette section seront présentées différentes stratégies de livraisons des composants des endonucléases programmables.

4.1. Vectorisation de CRISPR-Cas9 par méthodes physiques :

4.1.1. L'électroporation

Le principe de cette technique consiste à soumettre des cellules à un courant électrique qui provoque la pénétration des composés tels les plasmides, des fragments d'ADN ou ARN, ou encore des protéines (112). Les cellules ou les tissus sont premièrement exposés à une solution contenant les composés à livrer. Deuxièmement, sous l'effet de la pulsion électrique, les membranes cellulaires deviennent perméables ce qui permet donc aux composés se trouvant en solution de diffuser à travers celle-ci. Cette méthode bien qu'elle puisse entraîner une certaine mortalité dans les cellules ou tissus traitées sous l'effet du choc électrique, elle permet une livraison directe et rapide. Ce moyen de vectorisation est utilisé, car plus adapté, au traitement de cellules *ex vivo* qui seront retransférées ensuite aux patients par une greffe ou par transfert adoptif, en revanche il est non ou difficilement envisageable pour traiter un organisme complet étant donné les risques associés au choc électrique.

4.1.2. L'ultrason

Dans cette approche, le matériel à livrer est encapsulé dans une suspension de vésicules lipidiques, puis directement administré *in vivo* par voie intraveineuse. En soumettant localement un tissu à des ultrasons, les membranes cellulaires et les microbulles lipidiques entrent en oscillation ce qui favorise l'endocytose de ces dernières et le relargage du contenu dans le cytoplasme (113). Cette livraison a prouvé son efficacité pour livrer l'ADN plasmidique, le siRNA et des drogues dans le foie, le cerveau, les reins ou encore le cœur dans des modèles animaux (114–116).

4.2. Vectorisation de CRISPR-Cas9 par les virus : Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux, malgré leur coût de production qui peut s'avérer parfois élevé, sont des vecteurs de choix ; car ils permettent une efficacité de transduction de nombreux types cellulaires et peuvent notamment se disséminer efficacement dans l'organisme lors d'une administration systémique. On détaillera dans cette partie les différents types de vecteurs viraux.

4.2.1. Les rétrovirus et lentivirus

Les lentivirus sont une sous-famille issue de rétrovirus. Parmi les vecteurs lentiviraux (LV), ceux dérivés du rétrovirus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), sont les plus couramment utilisés pour le transfert de gène *in vitro* et *ex vivo*. Ce sont des virus à ARN à partir desquels, seuls les gènes essentiels à la production des particules virales et à l'encapsidation du matériel génétique ont été conservés. Ainsi, par l'intermédiaire des gènes Gag-Pol, Rev, ou encore VSV-G il est possible de produire de nouvelles particules virales recombinantes. Celles-ci préservent leur capacité à transduire un grand nombre de lignées cellulaires (de par le large tropisme de l'enveloppe VSV-G), en prolifération ou dans un état quiescent, et permettent l'intégration stable dans leur génome du transgène d'intérêt et d'en permettre une expression durable dans le temps (117). Il est cependant possible de pseudotyper ces vecteurs en modifiant leur enveloppe afin de permettre de restreindre leur tropisme à certains types cellulaires (118). En effet, si ces vecteurs étaient administrés par voie systémique, les particules virales transduiraient trop rapidement les cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocyte, monocyte, macrophage) avant même d'avoir atteint un éventuel organe cible (119). Par ailleurs, ces virus recombinants sont incapables de se répliquer ce qui les rend non pathogéniques pour les cellules. Enfin, ces vecteurs représentent un intérêt particulier de par leur capacité à contenir jusqu'à ~10 kb d'ARN ce qui est compatible avec la taille des ZFNs, TALENs et CRISPR/Cas9(120).

La principale limite à l'utilisation d'un rétrovirus est sa possible insertion aléatoire dans le génome de la cellule hôte. Cela s'est déjà montré particulièrement néfaste au cours d'un essai clinique chez des patients SCID (Syndrome d'immunodéficience combiné grave) traité avec un vecteur γ -retroviral, où 5 des 20 patients traités ont développé une leucémie (121,122). De façon générale, ce type de vecteur peut représenter un risque si son génome s'insère à proximité d'un proto-oncogène ou s'il altère l'expression d'un gène suppresseur de tumeur (123). Afin de limiter un tel risque, de nouveaux variant de LVs ont été modifiés de sorte à inhiber les propriétés d'intégration dans le génome du matériel encapsidé, notamment à travers des mutations qui inactivent les protéines intégrases (124). Ainsi, les lentivirus non-intégratifs semblent davantage sécuritaires dans le cadre d'application clinique en

comparaison aux vecteurs γ -retroviraux qui sont intégratifs. Il est également envisagé d'avoir recours uniquement aux propriétés de transduction des LVs et de les utiliser pour envelopper et livrer directement les protéines ZFNs, TALENs ou encore CRISPR(125,126).

4.2.2. Les adénovirus

Les adénovirus (Adv), dont il en existe près de 60 sérotypes différents, sont des virus non-enveloppés à ADN double brin pouvant contenir jusqu'à 36~kb. Le sérotype 5 (Adv5) est l'un des plus utilisés et qui est particulièrement efficace dans la transduction d'une multitude de lignées cellulaires humaines ce qui en fait un vecteur d'intérêt en thérapie génique. Tout comme les LVs, les Adv infectent tout aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en prolifération mais leur génome ne s'intègre pas dans celui des cellules hôtes (127,128).

Cependant, ces vecteurs sont particulièrement immunogéniques et sont responsables de l'initiation d'une forte réponse immunitaire innée et acquise. Leur utilisation a été particulièrement freinée à la fin des années 90s lorsqu'un patient de 18 ans est décédé lors d'un essai clinique, 4 jours seulement après avoir été traité avec un Adv pour sa déficience en ornithine carbamoyltransférase (129). Cette immunogénicité est également problématique dans la mesure où les cellules transduites par un tel vecteur peuvent être éliminées en réponse à une réponse cellulaire cytotoxique médiée par les lymphocytes T(130,131) .

Ces limitations majeures ont donc amené au développement des Adv à grandes capacités (High-Capacity Adv, HC-Ad) qui ne contiennent aucun gène d'origine viral réduisant ainsi la réponse immunitaire cytotoxique ce qui permet une expression plus durable du transgène (132,133). Cependant leur production nécessite le recours à un adénovirus dit « helper » qui permet de répliquer l'ADN du HC-Ad, de former ses capsides protéiques et d'y emballer l'ADN. Ainsi lors de la purification des HC-Ad, la possibilité de contamination par des virus « helper » hautement immunogènes est un risque non négligeable.

De par la grande quantité d'ADN que les HC-Ad peuvent contenir, ces vecteurs sont adaptés à la livraison de ZFNs, TALENs et CRISPR/Cas9 bien que pour le moment leur utilisation soit encore restreinte à des applications *ex vivo* (134,135)

4.2.3. Les virus adéno-associés

En 1965, les virus adéno-associés (adeno-associated virus, AAV), ont été identifiés comme contaminants de préparations d'adénovirus et dont la réplication dépend directement de ces derniers (136). Les AAV sont des virus non-enveloppés contenant un ADN simple brin pouvant contenir jusqu'à ~4.7 kb (137). Le génome de ce vecteur est constitué par deux régions Rep et Cap, présents entre deux ITRs (Inverted Terminal Repeat)(138) . La région Rep code pour des éléments qui permettent la réplication du génome du AAV et son intégration dans le génome de la cellule hôte. De façon intéressante, l'intégration du génome du AAV dans le génome d'une cellule hôte humaine se ferait préférentiellement dans le chromosome 19 (139). Mais il est à noter que la suppression de cette région Rep permet d'annihiler les propriétés de réplication du génome viral ainsi que l'intégration dans le génome de l'hôte. Ensuite, la région Cap code pour les protéines VP1, VP2 et VP3 qui s'autoassemblent pour former la capsid des AAVs. Ce sont les propriétés de la capsid qui définissent le tropisme des AAVs pour leurs cellules hôtes cibles. A l'heure actuelle, 14 sérotypes de AAVs ont été identifiés et ils se distinguent les uns des autres par leurs propriétés à infecter des cellules *in vitro* et leur tropisme pour les organes *in vivo* (140) (Figure 23) . Ces vecteurs présentent la particularité d'infecter une multitude d'organes chez l'humain sans être pathogénique, malgré une possible réponse humorale qui se fait par la production d'anticorps neutralisants(137) .Ainsi, l'absence d'immunogénicité préalable pour certains sérotypes d'AAV et la diversité des tropismes possibles pour ces sérotypes en font des vecteurs d'intérêt pour des applications en thérapie génique.



Fig. 23 : Plusieurs sérotypes de AAV permettent de cibler précisément différents types de tissus. Chaque sérotype de AAV présente un tropisme particulier pour certains tissus. Notamment, le sérotype AAV9 (gris) permet de cibler à la fois le cœur mais aussi les muscles squelettiques (141).

Ainsi, des vecteurs AAVs recombinants (rAAV) ont été créés en retirant les régions Cap et Rep et en préservant seulement les séquences ITRs qui permettent l'encapsulation de l'ADN. Les rAAVs peuvent donc permettre la livraison d'un transgène ou d'un ADN simple brin d'intérêt de 4.7 kb dans une grande diversité de cellules/tissus, et offrent une alternative particulièrement sécuritaire pour des applications en thérapie génique en comparaison aux vecteurs LVs et Advs.

L'utilisation des rAAVs en thérapie génique peut être limitée par la taille du promoteur et du transgène à transférer dans une cellule si elle dépasse la capacité de stockage du vecteur. Mais pour contourner cette limitation, les gènes des endonucléases (ZFNs ou TALENs) et le système CRISPR/Cas9 peuvent être insérés dans les rAAVs ce qui offre la possibilité de modifier directement un gène muté plutôt que d'en livrer une copie fonctionnelle (142). Cependant, un rAAV ne peut contenir qu'un seul des deux monomères de TALENs nécessaires pour faire une coupure double brin. Ainsi l'utilisation des TALENs en édition

génomique requiert l'utilisation d'au moins 2 rAAVs, voire 4 rAAVs pour les approches visant à faire une délétion dans l'ADN. Cela engendre donc des coûts de production particulièrement élevés pour cette technologie. Bien que beaucoup plus laborieux dans leur conception, 2 monomères de ZFNs peuvent être codés dans un seul rAAV qui peut également contenir un ADN donneur afin d'induire une mutation par recombinaison homologue (143). Enfin, pour le système CRISPR, plusieurs situations sont à considérer. En effet, l'utilisation de CRISPR/SpCas9 requiert l'utilisation d'au moins 2 rAAVs, le premier qui permet l'expression de la SpCas9 et le second qui permet l'expression d'un ou plusieurs ARNg(144). D'autre part, le gène de la SaCas9 étant plus petit de ~1 kb que celui de la SpCas9, un unique vecteur rAAV peut permettre sa livraison en plus d'un ARNg(102,145).

4.3. Les vecteurs non viraux

Alors que les vecteurs viraux, tels que les rAAVs, permettent une livraison ciblée et potentiellement sécuritaire d'endonucléases dans des cellules/tissus d'intérêts, le maintien de leur expression peut être à l'origine d'effets délétères à plus long terme, tels que l'augmentation de la fréquence des effets off-targets ou encore le développement d'une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre le produit du transgène. De plus, de nombreux individus présentent une immunité dirigée contre les AAVs sous la forme d'anticorps préexistants, ce qui peut les rendre inéligibles à des traitements par thérapie génique avec ce type de vecteur.

Afin de contourner ces deux limitations majeures, le recours à des vecteurs non-viraux qui visent à livrer directement un ARNm codant pour les systèmes d'endonucléase, ou les protéines purifiées, est envisagé. Certaines de ces approches sont présentées dans cette section.

4.3.1. Liposomes, polymères et nanoparticules

Par l'intermédiaire de charges électrostatiques, il est possible de charger des liposomes, des polymères (ex : le PEI) ou d'autres particules cationiques avec des acides nucléiques ou des protéines dont la charge est négative (151,144,145). Cependant, l'utilisation de ces vecteurs cationiques ne permet pas de livrer de façon universelle tous les types de protéines

dont les charges électrostatiques sont hétérogènes d'une protéine à l'autre. Ainsi, il est envisagé de coupler des peptides poly-anioniques à des protéines cationiques afin de permettre leur livraison avec des vecteurs cationiques. De tels modifications ont ainsi permis la livraison de protéine TALE et de complexes Cas9/ARNg dans des cellules en culture(68,151,146). Dans le cas de la livraison de Cas9/ARNg, c'est la charge anionique de l'ARNg qui confère au complexe Cas9/ARNg une charge globalement négative qui permet de le combiner à un vecteur cationique.

Des structures plus complexes comme le CRISPR-Gold peuvent également être élaborées (149,150). Cette structure est formée par un cœur de nanoparticules d'or qui sont greffées à des oligonucléotides comportant des groupements -thiol qui s'hybrident avec un ADN donneur simple brin. Ces complexes Cas9/ARNg vont ensuite interagir avec cette structure par l'intermédiaire de l'affinité de la Cas9 pour l'ADN. Le tout est alors recouvert de silice aux propriétés anioniques puis complexé avec un polymère cationique ayant des propriétés de déstabilisation de l'endosome afin d'augmenter la livraison cytoplasmique de l'ADN donneur et de Cas9/ARNg.

4.3.2. Peptides de transduction et de perméabilisation

Les peptides de transduction, plus communément connus sous le nom de CPP (Cell Penetrating Peptides), sont des peptides ayant la capacité de fusionner avec les membranes plasmidiques des cellules et d'accéder à leur cytoplasme. En fusionnant de tels CPPs à une protéine d'intérêt, celle-ci peut être livrée directement dans une cellule sans avoir recours à une électroporation ou des agents de transfection. Cette stratégie a donc été reprise afin de livrer directement les endonucléases ZFNs, TALENs et Cas9 et a permis d'éditer des gènes cibles aussi bien *in vitro* que *in vivo*(151–153) . Dans le cas du système CRISPR/Cas9, l'édition génomique nécessite la présence d'une protéine Cas9 complexée à un ARNg. Pour cela, la protéine Cas9 peut être livrée dans des cellules sous forme d'une protéine fusionnée à un CPP tel qu'un motif de poly arginine ou encore une protéine tat (protéine de transduction isolée depuis le VIH-1)(151). Concernant les ARNg, à défaut de pouvoir être fusionné à des CPPs ils peuvent cependant être livrés séparément en les complexant, par des interactions électrostatiques, à un CPP cationique(154,155).

La compagnie québécoise Feldan Therapeutics a développé en 2018 une gamme de peptides, portant le nom de Feldan Shuttle (FS), qui permettent la livraison de complexes ribonucléoprotéiques Cas9/ARNg dans une grande diversité de cellules(156) . Ces FS sont dérivés du peptide PTD4, un variant de la protéine Tat provenant du VIH-1, ayant des propriétés de liaison et de translocation au travers des membranes plasmiques. Ce peptide a été fusionné à un domaine CM18 qui permet de limiter la capture du FS dans l'endosome et favorise un relargage dans le cytoplasme. La capacité du FS à ne pas rester bloqué dans l'endosome est également amplifiée par l'ajout de 6 histidines dont le rôle est de déstabiliser les membranes du compartiment endosomal. Finalement, ce peptide multifonctionnel permet la livraison de complexes Cas9/ARNg dans les cellules par une translocation au travers de pores formées par le FS, ou par endocytose suivi d'un relargage dans le cytoplasme après l'échappement depuis l'endosome (Figure 24).

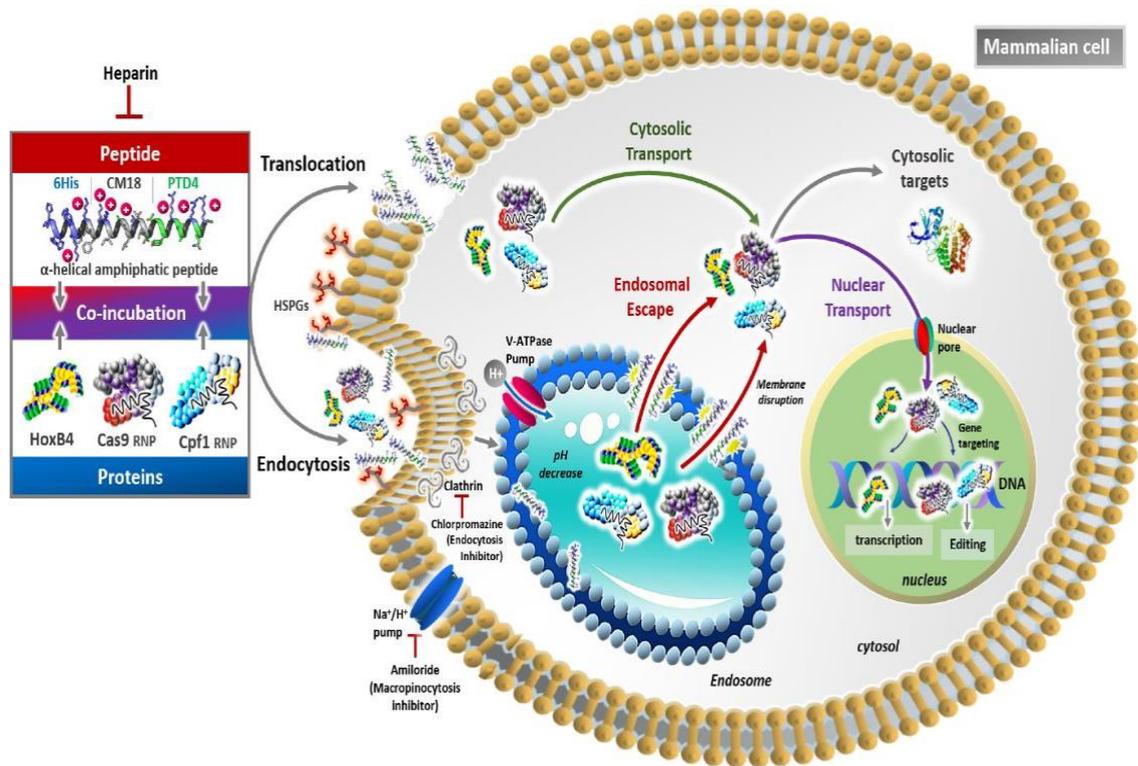


Fig. 24 : Principe de fonctionnement du Feldan Shuttle pour la livraison de protéines et/ou d'acides nucléiques. Par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, le cargo se couple au Feldan Shuttle. Au contact de la membrane des cellules, le complexe Feldan Shuttle/cargo peut être transduit directement au travers de la bicouche lipidique ou transite par l'endosome. Une fois dans le cytoplasme, le complexe se dissocie pour libérer le cargo.(156)

Au-delà de limiter le recours à des vecteurs viraux, dont les coûts de production sont très élevés, la livraison de Cas9 sous formes de protéines recombinantes complexées à un ou plusieurs ARNg, permettrait de réduire la possibilité de mutations hors-cibles. Sous cette forme, les complexes Cas9/ARNgs sont dégradés en l'espace de 24h ce qui serait suffisant pour permettre une bonne efficacité d'édition sur la cible d'intérêt tout en réduisant l'accumulation de mutations hors-cible qui seraient induites par une exposition prolongée à l'endonucléase (151,154).

4.4. Plasmide exprimant Cas9 et le gRNA :

Un plasmide est produit par une bactérie ; Il s'agit d'éléments extra-chromosomiques circulaires capables de se répliquer (de 1 à 100 copies) dans la bactérie et d'être transmis dans les cellules filles lors de divisions cellulaires. Dans la nature, les plasmides peuvent être échangés entre différentes espèces de bactéries. Ces plasmides peuvent disséminer ainsi de nouvelles caractéristiques tels que des résistances aux antibiotiques, à des métaux-lourds, ou encore de rendre les bactéries virulentes.

Un plasmide se présente sous forme d'un matériel génétique composé des éléments suivants (158) :

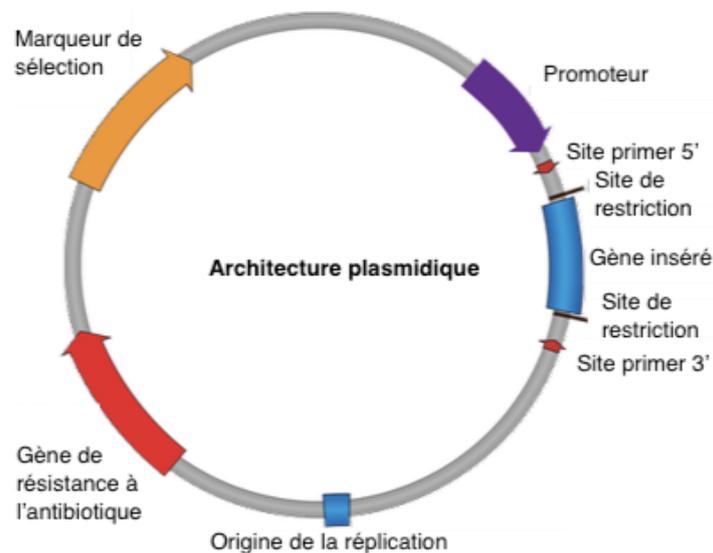


Fig. 25 : Architecture plasmidique(159)

- **Origine de réplication (ORI)** : elle dirige l'initiation de la réplication plasmidique.
- **Gène de résistance à l'antibiotique** : c'est un gène qui confère la résistance à l'ampicilline, il permet la sélection de bactéries contenant des plasmides.
- **Site de clonage multiple (MCS)** : est un court segment de l'ADN , qui contient de nombreux (jusqu'à ~20) sites de restriction permettant une insertion facile de l'ADN par digestion et ligature des enzymes de restriction.
- **L'insert** : est le gène, le promoteur ou tout autre fragment d'ADN cloné dans le MCS. C'est généralement l'élément génétique que l'on souhaite étudier en utilisant un plasmide particulier.
- **La région du promoteur** : pilote la transcription de l'insert. Le promoteur est conçu pour recruter la machinerie transcriptionnelle d'un organisme particulier ou d'un groupe d'organismes.
- **Marqueur de sélection** : il sélectionne les cellules qui ont réussi à absorber le plasmide dans le but d'exprimer l'insert.
- **Site primer de liaison des amorces** : Courte séquence d'ADN simple brin utilisée comme point d'initiation pour l'amplification par PCR ou le séquençage de l'ADN du plasmide.

Ce type de système d'acheminement existe sous forme de kit commercialisé par l'entreprise Addgene permettant la construction de vecteurs CRISPR-cas9 exprimant plusieurs gRNA et une nucléase cas9. (158)

Si cette méthode s'est avérée extrêmement précieuse pour les scientifiques, elle présente néanmoins certaines complications potentielles dont il faut tenir compte :

- Les cellules doivent se prêter à la transfection ou à la transduction virale.
- Des promoteurs appropriés doivent être choisis pour l'expression de Cas9 et de l'ARNg.
- L'ADN plasmidique peut être incorporé dans le génome.

- Des effets hors cible peuvent se produire en raison de l'expression prolongée de Cas9.
- La nécessité de la transcription et de la traduction de Cas9 retarde l'édition.

4.5. Quel système d'expression choisir ?

Le choix du type de vecteur est essentiel lors du développement d'un nouveau traitement particulièrement en thérapie génique *in vivo*. L'efficacité de ce dernier est très dépendante de la capacité de l'acide nucléique à atteindre la cellule cible. Nous avons vu précédemment que du fait de cette nécessité, de nombreuses méthodes ont été développées. Le choix du vecteur se fait donc selon plusieurs facteurs :

- 1) **Le type de thérapie génique à développer, *in vivo* ou *ex vivo*** : du fait que certains organes sont plus accessibles que d'autres lors d'une utilisation *in vivo*, certains vecteurs en parallèle seront plus adaptés à ce type d'utilisation. Il reste à surmonter le challenge majeur de la délivrance *in vivo* qui est l'effet « off-target », c'est-à-dire d'éviter toute atteinte de cellules non cibles et qui ne sont pas d'intérêt. Il faut également considérer le tropisme du vecteur, dans une même famille de virus on peut trouver des sous types ayant des tropismes différents. Dans une étude menée par l'équipe de Carmela Zincarelli(160), il a été mis en évidence que le profil de distribution de chaque sous type est différent (figure 26)

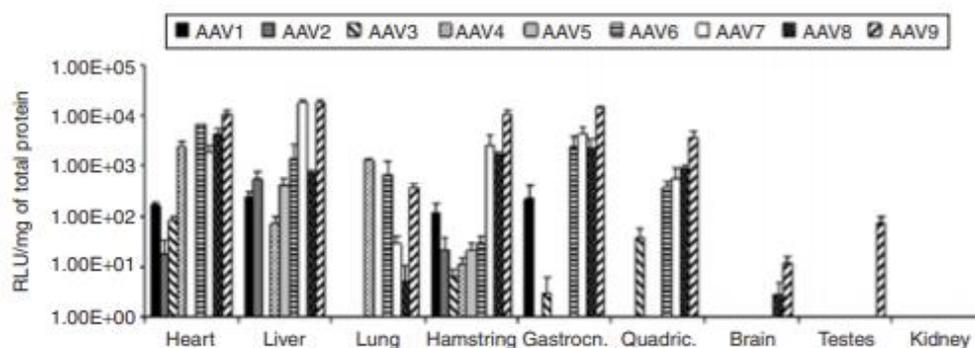


Fig. 26 : Tropisme des sous types d'AAV (160)

- 2) **Évaluer si l'expression du gène** transféré serait transitoire ou stable dans son application thérapeutique. Certains vecteurs vont s'intégrer au génome de l'hôte tandis que d'autres non, c'est justement cette intégration qui va être responsable de l'effet transitoire ou stable de la thérapie, et selon l'effet thérapeutique souhaitable, le choix du vecteur sera différent.
- 3) **La taille du gène à transférer** : les vecteurs viraux présentent des capacités spécifiques et différentes d'un type à l'autre.
- 4) **Le type de la molécule à délivrer** : certaines méthodes de transfection seront plus adaptées à l'ADN qu'à l'ARN par exemple.
- 5) **La cytotoxicité des méthodes de transfert** : certaines technologies peuvent avoir des conséquences toxiques importantes, il faut notamment préciser qu'une même technologie peut présenter des profils de toxicité différents selon la cellule cible.
- 6) **Enfin, le coût** qui est un facteur majeur à prendre en compte lors du choix du vecteur. Généralement les méthodes virales présentent un coût de production élevé, tandis que d'autres sont moins chers à produire.

Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive, ni d'une liste hiérarchique, chaque technique a ses avantages et ses inconvénients. Le choix de vecteur est primordial, et se base sur de nombreux critères permettant l'obtention de l'objectif thérapeutique voulu.

Après avoir revu les points les plus importants sur lesquels se fondent la biotechnologie CRISPR-cas9, de la découverte de l'ADN jusqu'à les moyens d'utilisation de CRISPR, il semble pertinent de faire ensuite un état des lieux actuel de cette biotechnologie.

CHAMPS D'APPLICATION DU SYSTÈME CRISPR CAS9

5. CHAMPS D'APPLICATION DU SYSTEME CRISPR CAS9 :

L'outil d'édition du génome CRISPR/Cas-9 a un grand nombre d'applications dans de nombreux domaines, dont la médecine, l'agriculture et les biotechnologies. En agriculture, il pourrait aider à l'immunisation de certaines espèces contre les virus pour améliorer leur valeur nutritionnelle. En médecine, il est étudié pour les cancers, le VIH et la thérapie génique, notamment pour la drépanocytose, la mucoviscidose et la dystrophie musculaire de Duchenne.

5.1. En agriculture :

Au delà des applications thérapeutiques de la technologie CRISPR, c'est dans le domaine de l'agronomie qu'elle risque de connaître un développement colossal dans un futur proche.

5.1.1. Cas du champignon qui ne brunissait pas :

Concernant l'usage de CRISPR dans le domaine agricole, l'USDA, acronyme de *United State Department of Agriculture* a rendu le 13 Avril 2016 une décision très médiatisée. Ayant été encouragé à soumettre son dossier par des membres de ce département(161), Yinong Yang un biologiste végétal de l'université de Pennsylvanie déposa un dossier auprès de l'institution gouvernementale. Son cas : une édition par CRISPR visant à réduire le brunissement de l'*Agaricus bisporus*, le champignon de Paris en ciblant la polyphénol oxydase (PPO). La réponse du département de l'agriculture américain fut favorable « *il ne considère pas l'édition par CRISPR-Cas9 décrite ici comme devant être régulée* ». La base de cette décision provenant du fait que pour cette modification génétique, aucun matériel étranger à la plante n'a été inséré dans son génome, c'est un *knock out* par Cas9 et ses guides ARN qui a été réalisé, la modification ne tombe donc pas dans les critères impliquant la régulation. Cela signifie que ces champignons pourront être cultivés puis vendus aux Etats-Unis sans passer par les longs et coûteux processus d'approbation requis par l'agence. Il est donc le premier organisme « *CRISPR* » à recevoir le feu vert du gouvernement américain et crée un précédent historique. L'USDA avait auparavant estimé qu'elle pratiquait une sur- régulation des OGMs(162) et suite à cette décision, nombreux sont ceux qui y voient le signe d'un fléchissement de leurs exigences réglementaires(163).

5.1.2. Prémunition des tomates contre les potyvirus

Les potyviridae sont la plus grande famille de virus à ARN des plantes, qui représentent environ 30 % des virus connus des plantes et causent des dommages considérables aux plantes cultivées(164). Les gènes du facteur d'initiation de la traduction eucaryote (eIF), tels que le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E), le facteur d'initiation de la traduction eucaryote (Iso) 4E (eIF(iso)4E) et le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4G (eIF4G), sont nécessaires aux virus à ARN pour maintenir leur cycle de vie. D'après une étude réalisée par une équipe de scientifiques (Yoon et al. 2020) du College of Agriculture and Life Sciences, Seoul, South Korea, on a constaté que les mutants de knock-out de l'eIF4E2 et de l'eIF(iso)4E de la tomate étaient totalement sensibles aux potyvirus, ce qui suggère un rôle important de l'eIF4E1 dans la résistance aux potyvirus chez les cultures solanacées et pour vérifier si de nouvelles mutations spécifiques de la séquence eIF4E1 chez *Solanum lycopersicum* (tomate) cv. Micro-Tom pouvaient conférer une résistance accrue aux potyvirus. Cette approche a produit des mutations homozygotes héréditaires dans la génération E1 sans transgène. L'analyse de la séquence de eIF4E1 des plantes transgéniques E0 exprimant les transcrits Cas9 et eIF4E-sgRNA a identifié des délétions chimériques allant de 11 à 43 pb. L'analyse du génotype des lignées éditées de eIF4E1 dans les plantes de tomates transgéniques E0, E1 et E2 a montré que les mutations étaient transmises aux générations suivantes. Lorsque les lignées mutantes homozygotes ont été testées pour leur résistance aux potyvirus, elles n'ont présenté aucune résistance au virus de l'attaque du tabac (TEV). Cependant, plusieurs lignées mutantes n'ont montré aucune accumulation de particules virales lors d'une infection par le virus de la marbrure du poivron (PepMoV). Ces résultats indiquent que la mutation spécifique du site de l'eIF4E1 de la tomate a réussi à conférer une résistance accrue au PepMoV. Ainsi, cette étude démontre la faisabilité de l'utilisation de l'approche CRISPR/Cas9 pour accélérer la sélection en vue de l'amélioration des caractéristiques des plants de tomate.(165)

5.2. En infectiologie :

5.2.1. Cas du VIH

CRISPR/Cas9 peut être conçu pour moduler avec succès un ensemble d'éléments génétiques pathogènes. Nous examinons les divers rôles que CRISPR/Cas9 peut jouer pour

cibler le VIH et éradiquer l'infection. La nucléase Cas9, couplée à un ou plusieurs petits ARN guides, peut cibler le provirus pour exciser le génome viral intégré. De plus, une Cas9 modifiée, déficiente en nucléase, fusionnée à des domaines d'activation de la transcription, peut induire une activation ciblée de l'expression du gène proviral, permettant ainsi de purger les réservoirs latents. Ces technologies peuvent également être exploitées pour cibler les facteurs de dépendance de l'hôte tels que le co-récepteur CCR5, empêchant ainsi l'entrée du virus dans les cellules.

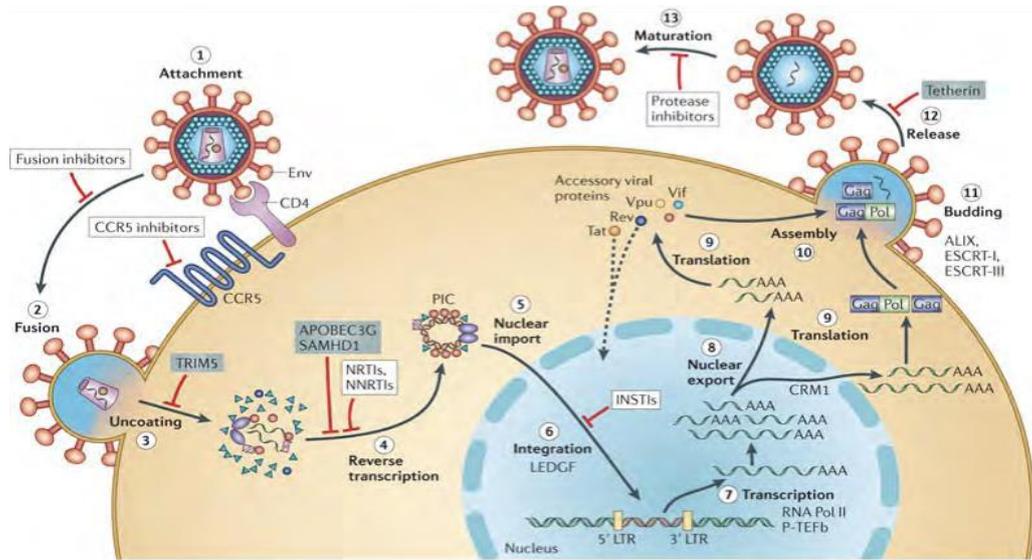


Fig. 27 : Cycle viral de HIV-1 divisé en étapes (166)

1 L'infection débute lorsque l'un des pics formés par la glycoprotéine d'enveloppe (Env) se lie au récepteur cellulaire CD4 et au récepteur trans-membranaire CCR5 (CC-Chemokine receptor 5). 2 Cela entraîne la fusion des membranes cellulaires et virales et l'entrée de la particule virale dans la cellule. 3&4 La perte partielle de l'enveloppe facilite la reverse transcription qui va produire le PIC ou pré-intégration complexe. 5&6 Après transport dans le noyau les intégrases associées au PIC orchestrent la formation du provirus intégré au génome, aidé par les protéines de liaison à la chromatine de l'hôte et le LEDGF (lens epithelium derived growth factor). 7 La transcription du provirus réalisée par l'ARN polymérase II de l'hôte (ARN Pol II) et le facteur d'élongation positif b (P-TEFb); produit des ARNm viraux de tailles différentes. 8 Les plus longs quittent le noyau par le transporteur CRM1. 9&10 Les ARNm serviront de matrice à la production protéique et de longs ARN seront incorporés dans les particules virales avec des composés protéiques. 11&12 Le bourgeoisement de la particule virale et sa libération hors de la cellule est contrôlé par les complexes ESCRT (pour endosomal sorting complex required for transport) et ALIX et s'accompagne (13) d'une maturation par les protéases afin de créer une particule virale infectieuse. LTR : longues répétitions terminales. INSTI : intégrase strand transfer inhibitor, NNRTI non nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI nucleoside reverse transcriptase inhibitor. Les sites d'action des inhibiteurs cliniques sont indiqués en blanc sur la Fig.22 ceux des facteurs de restriction cellulaires sont en bleu.

La première tentative d'application du système CRISPR/Cas9 à l'éradication du VIH/sida a été menée au Japon en 2013. Ebina et al. (167) ont essayé d'éliminer le provirus du VIH des cellules T en ciblant la région LTR du provirus du VIH.

Pour la prévention du VIH, de nombreux chercheurs se concentrent sur l'application de la technique CRISPR/Cas9 à la suppression ou à la perturbation de l'expression des récepteurs du VIH sur les cellules humaines. Étant donné que le CD4 est le récepteur primaire essentiel des cellules T humaines et qu'il est indispensable aux fonctions cellulaires normales, les récepteurs secondaires du VIH que sont le CXCR4 et le CCR5 sont souvent candidats à la suppression et à la perturbation par la technique CRISPR/Cas9. L'ingénierie du génome des cellules T est très prometteuse pour les thérapies cellulaires d'éradication du VIH en raison du développement rapide de l'édition de gènes. Hou et al. (168) ont efficacement perturbé le gène CXCR4 avec la technologie CRISPR/Cas9 dans des cellules T CD4+ primaires humaines. Dix sites au sein du gène CXCR4 ont été ciblés et l'expression de CXCR4 a diminué d'environ 30 %, comme le confirme le western blot. Les cellules T modifiées ont montré une résistance à l'infection par le VIH et la production de p24 a diminué de plus de 60 %. Plus important encore, cette technologie a indiqué une spécificité élevée et aucun effet hors cible, tandis que la division et la propagation cellulaires sont restées normales. (168) Schumann et al.(169) ont utilisé des ribonucléoprotéines Cas9/sgRNA (Cas9 RNP) pour supprimer l'expression du gène CXCR4 dans les cellules T humaines, et environ 40 % des cellules ont perdu l'expression de surface de CXCR4. Associés à un modèle de réparation, les RNP de Cas9 ont produit une modification du génome souhaitée dans les cellules T primaires humaines. Le séquençage profond a confirmé que les RNP de Cas9 ont obtenu une efficacité d'environ 20 % des modifications du génome knockin.(169)

En raison du succès du cas du patient de Berlin, Ye et al.(170) ont essayé de produire des cellules souches pluripotentes induites par CCR5 Δ 32 (iPSC) en utilisant le système CRISPR/Cas9. Une efficacité proche de 100 % a été obtenue pour la recombinaison homologue d'un seul allèle et jusqu'à 33 % pour les allèles doubles.



Fig. 28 : Timothy Brown en 2011(171)

Comme attendu, les monocytes et les macrophages dérivés de ces iPSC modifiées se sont révélés résistants à l'infection par le VIH. Wang et al. (172) ont appliqué la technologie CRISPR/Cas9 pour bloquer l'expression de CCR5 dans les cellules CD4⁺ humaines. Des vecteurs lentiviraux ont été utilisés pour cibler trois sites du gène CCR5. Le taux de perturbation du CCR5 était élevé, et ces cellules étaient résistantes au VIH à tropisme R5 avec un effet hors cible négligeable. Cependant, les tentatives de perturbation du gène CCR5 dans les cellules T primaires humaines avec la même approche ont échoué pour des raisons inconnues.

Outre la suppression ou la perturbation des récepteurs du VIH sur les cellules humaines, de nombreux scientifiques ont appliqué la technique CRISPR/Cas9 pour supprimer ou perturber le provirus du VIH dans les cellules humaines infectées de manière latente. Les études de cohorte CARES (CNS AIDS Research and Eradication Study) de Drexel Medicine(173) ont démontré ce qui suit :

- (1) les séquences LTR provirales dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont diminué chaque année avec le traitement antirétroviral ;
- (2) les séquences LTR du VIH ont continué à subir des modifications génétiques pendant au moins 6 ans, même avec un traitement antirétroviral suppressif efficace ;
- (3) l'analyse de séquençage de nouvelle génération (NGS) a révélé qu'un régime de sgRNA pouvait être conçu pour cibler toutes les quasi-espèces connues du VIH chez 50 % des patients analysés ; et

(4) le traitement HAART pourrait réduire l'échelle de sgRNA nécessaire pour éradiquer le provirus.

Pour la première fois, cette étude a démontré la faisabilité de l'élimination du provirus du VIH avec la technologie CRISPR/Cas9 chez un seul patient.(173)

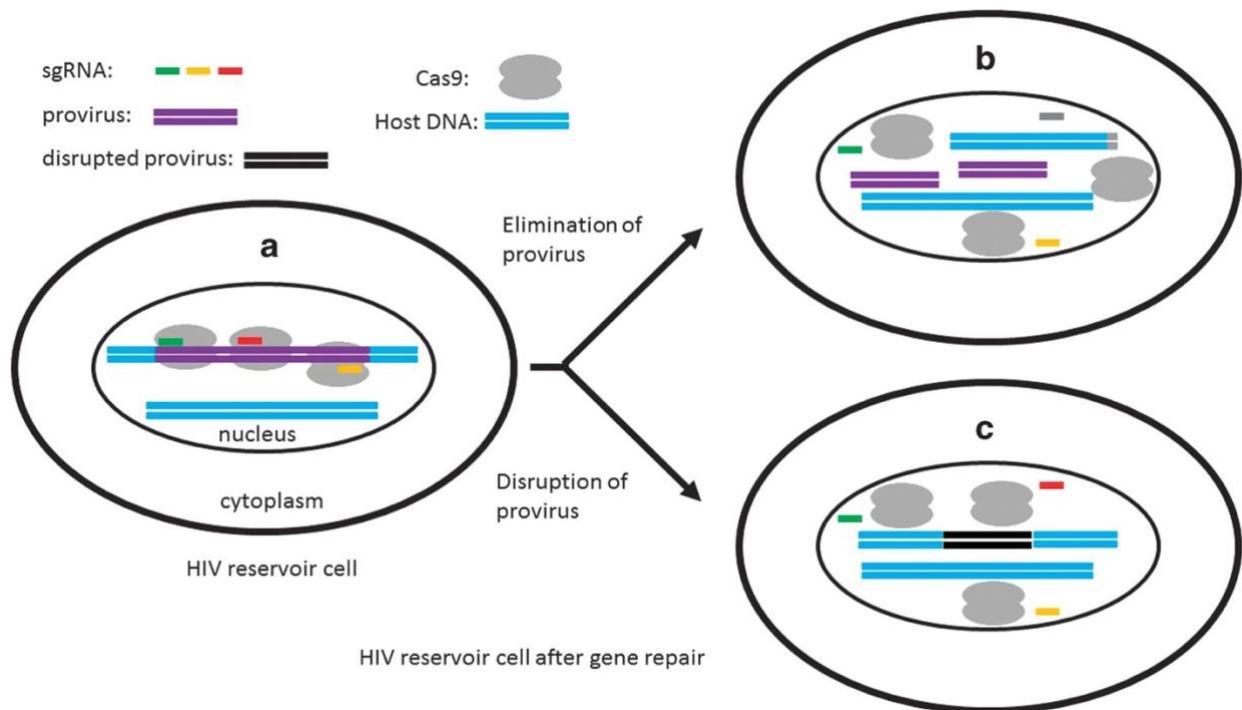


Fig. 29 : Application de la technologie CRISPR/Cas9 pour éradiquer les cellules réservoirs du VIH. La principale application de la technologie CRISPR/Cas9 pour éradiquer les cellules réservoirs du VIH (a) est d'éliminer (b) ou de perturber le provirus du VIH (c) du génome des cellules réservoirs hôtes. En détail, plusieurs sgRNA, qui ciblent deux ou plusieurs sites du provirus du VIH, sont appliqués aux cellules réservoirs du VIH avec Cas9. Cette action entraîne des coupures multiples au niveau des sites multiples du provirus du VIH, ainsi le provirus est retiré de l'ADN de la cellule hôte (b) ou le provirus est perturbé (c). L'ADN des cellules hôtes réservoirs du VIH est ensuite réparé par jonction terminale non homologue de l'ADN ou par réparation dirigée par homologie lorsque le modèle de réparation homologue est disponible (non montré).(173)

Conclusion :

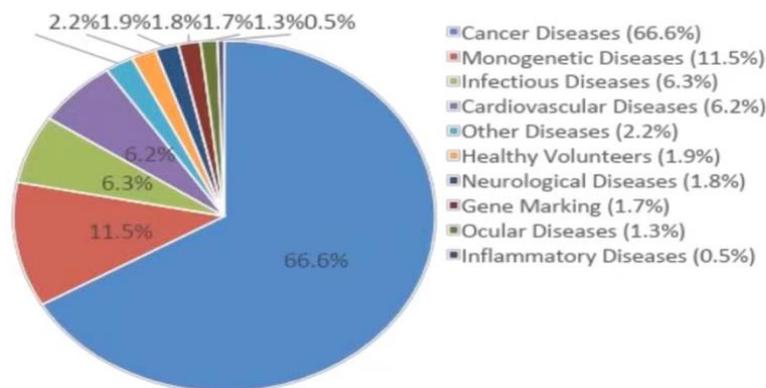
Pour l'avenir de l'application de la technique CRISPR/Cas9 à l'éradication des réservoirs de VIH, l'accent sera mis sur la sécurité, l'efficacité et la spécificité. Les efforts de recherche utilisant la technique CRISPR/Cas9 se concentreront désormais sur les modèles de primates et sur les essais cliniques de phase 1. Du point de vue de cette thèse, la technique CRISPR/Cas9

est très prometteuse pour l'éradication du VIH/SIDA. La FDA ayant déjà approuvé l'utilisation de la technique CRISPR/Cas9 dans plusieurs essais cliniques, le système CRISPR/Cas9 ne devrait pas tarder à être appliqué à la thérapeutique clinique et à la prévention du VIH/SIDA.

5.3. Cancérologie :

Parmi les indications de la thérapie génique, la cancérologie est celle qui a le plus été traduite en études cliniques. Bien qu'apportant des résultats mitigés elle a servi de tremplin clinique à la majorité des approches thérapeutiques. C'est donc logiquement que la technique CRISPR-Cas9 réalisa ses débuts cliniques en cancérologie. Ce fort pourcentage (figure 25) d'études cliniques s'explique par le fait que la thérapie génique appliquée au cancer est moins sujette aux limitations techniques qui peuvent s'appliquer aux maladies monogéniques par exemple.

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



www.fda.gov

The Journal of Gene Medicine © 2018 John Wiley and Sons Ltd, Adapted

4

Fig. 30 : Répartition des indications en thérapie génique(174)

5.3.1. Immunothérapie antitumorale et CRISPR-Cas9

Une compétition biomédicale a lieu, certains nomment Sputnik 2.0 cette course à l'application clinique de CRISPR-Cas9(175). D'un côté l'université de Pennsylvanie avec le soutien financier du *Parker Institute for Cancer Immunotherapy* (la fondation créé par Sean Parker, milliardaire fondateur de Napster et pionnier de Facebook). De l'autre des institutions chinoises qui ont déjà la primeur des premiers essais chez le singe et l'embryon(175,176). Les deux équipes prévoient une approche similaire, prélever puis éditer le génome de lymphocytes T des patients pour y éteindre le gène PD-1 avant de les réintroduire dans la circulation sanguine. La voie anti-PD-1 (ou inhibiteurs de points de contrôle, qui agissent au niveau de la jonction entre la cellule immunitaire (lymphocyte T) et les protéines à la surface des cellules cancéreuses) est une voie validée depuis peu qui connaît un essor considérable avec l'accès au marché d'anticorps anti-PD-1 nivolumab et pembrolizumab(177,178).

PD-1 ou *programmed cell death 1* est une protéine de surface cellulaire exprimée par les lymphocytes T, l'un de ses ligands PDL-1 exprimés par les cellules saines est un des *checkpoints* qui permet d'empêcher l'activité des LT et NK, permettant une régulation de l'immunité et une tolérance au *soi*(179). C'est cette propriété qui est détournée par des cellules tumorales qui expriment PDL-1 et échappent alors à l'immunosurveillance. La création de lymphocytes T dont le gène codant PD-1 est inactivé par la cas9 guidée par sgARN permet d'obtenir une réponse immunitaire boostée, dirigée contre la tumeur(180). S'agissant d'une manipulation ex-vivo, le criblage et la sélection des LT avant injection est possible et permet de s'affranchir des préoccupations d'effets hors cible de la cas9. Par contre les risques d'auto-immunité inhérente à la technique persistent.

Des deux équipes en lice après approbation de leurs projets d'essais cliniques par leurs comités respectifs (175) c'est celle du *West China Hospital*, hopital universitaire de la *Sichuan University* à Chengdu qui fut la première à avoir le feu vert pour débiter leur étude dirigée par le Professeur You Lu. Le 28 octobre 2016 fut débuté l'essai NCT02793856 examinant l'efficacité et la sécurité d'une injection de lymphocyte T modifiés chez des patients atteints de cancer du poumon métastatique non à petites cellules (*non-small cell lung cancer*) réfractaires aux traitements traditionnels. Cet essai de phase I a recruté 10 patients qui recevront entre 2 et

4 injections successives puis seront suivies pendant 6 mois, les premiers résultats ont été publiés le 21 Décembre 2020 et les derniers le 12 Janvier 2021.

Dans cette étude :

- Tous les effets indésirables dus au traitement par cellules T éditées par PD-1 subis par les sujets inscrits étaient de grade ½, ce qui suggère que le traitement de l'étude a été bien toléré.
- La médiane de la survie sans progression et de la survie globale était de 7,7 semaines (intervalle de confiance [IC] à 95 % = 6,9-8,5 semaines) et de 42,6 semaines (IC à 95 % = 10,3-74,9 semaines), respectivement.
- La fréquence médiane des événements de mutation hors cible était de 0,05 %, avec une fourchette de 0 à 0,25 %.
- Cette étude a démontré pour la première fois que l'application clinique de la thérapie par cellules T éditées par CRISPR-Cas9 PD-1 est sûre et réalisable.

Dans l'ensemble, la sécurité et la faisabilité de la thérapie par cellules T éditées par CRISPR-Cas9 PD-1 ont été démontrées dans une cohorte de patients atteints de CBNPC avancé. Cependant, compte tenu des limites de cette étude, des technologies d'édition de gènes plus efficaces devraient être adoptées dans les études futures.(181)

Conclusion :

Mais comme nous l'avons vu dans l'exemple précédent, l'édition génomique pourrait permettre de révolutionner l'immunothérapie antitumorale en améliorant l'efficacité des traitements ou en leur permettant de s'affranchir des inconvénients de leur production. Cette approche pourrait alors devenir une alternative complémentaire aux autres stratégies thérapeutiques.

5.4. Cécité :

CRISPR est un excellent candidat pour traiter la cécité génétique. Pour de nombreuses formes de cécité héréditaires, les mutations spécifiques à l'origine de la maladie sont connues, ce qui permet de modifier facilement à l'aide de CRISPR-Cas9 ces gènes.

De plus, l'œil est une partie immunoprotégée du corps, ce qui signifie que l'activité du système immunitaire y est limitée. Cela devient un avantage compte tenu des préoccupations qui ont récemment été soulevées concernant la possibilité que CRISPR puisse induire des réactions immunitaires à son encontre, ce qui bloquerait son activité et entraînerait des effets secondaires.

Editas Medicine travaille sur un traitement CRISPR de l'amaurose congénitale de Leber, la cause la plus courante de cécité infantile héréditaire, pour laquelle il n'existe aucun traitement(182). La société vise à cibler la mutation la plus commune derrière la maladie, en utilisant CRISPR pour restaurer le fonctionnement des cellules photoréceptrices avant que les enfants ne perdent complètement la vue.

En utilisant CRISPR, Editas vise à restaurer la fonction de ces cellules en modifiant le gène muté, connu sous le nom de CEP290. (Parfois appelée amaurose congénitale de Leber de type 10, la maladie est également appelée dégénérescence rétinienne liée à CEP290).

Les résultats initiaux, publiés le 21 Septembre 2021, des six premiers participants à l'étude référencée NCT03872479(183) indiquent que le traitement, qui a été administré par une injection sous-rétinienne dans un œil, était largement sûr. Aucun effet secondaire ou toxicité grave, comme une perte de perception de la lumière ou une inflammation persistante, n'a été signalé, a déclaré Editas. Certains patients ont présenté une légère inflammation liée au traitement qui a été contrôlée par des stéroïdes. Quatre ont ressenti des douleurs oculaires.

Selon Mark Pennesi, chef de la division de la génétique ophtalmique au Casey Eye Institute de l'Oregon Health & Science University et investigateur de l'étude, une légère inflammation et une douleur sont souvent associées à l'injection et à la chirurgie connexe.

Les données sur l'efficacité sont toutefois plus mitigées. Editas a mis en place son étude pour tester trois doses différentes de sa thérapie, connue sous le nom d'EDIT-101. La dose la plus faible - administrée aux deux premiers patients recrutés - était principalement destinée à évaluer la sécurité et les risques potentiels, a déclaré Lisa Michaels, médecin-chef de la société.

Selon une présentation de la société, le traitement a entraîné des "changements indéterminés" et des "résultats variables" pour ces patients, respectivement sur deux mesures de la fonction visuelle et sur un test de type labyrinthe utilisé par Editas pour évaluer la vue fonctionnelle.

Les résultats de la dose intermédiaire étaient plus prometteurs, notamment pour le premier patient recruté dans ce groupe, une femme de 54 ans présentant une perte de vision sévère. Les premiers changements sur les trois mesures se sont maintenus à six mois, a déclaré Editas, montrant des améliorations de l'acuité visuelle, de la sensibilité rétinienne et de sa capacité à naviguer dans le labyrinthe à des niveaux de lumière plus faibles.

"Je peux voir les lignes plus clairement maintenant. J'ai été capable de trouver des choses sur le sol avec mes yeux parfois", a cité Editas en citant les propos de la patiente dans sa présentation des données. "Ce n'est pas tout le temps, mais j'ai été capable de remarquer des objets sur le sol plus qu'avant le traitement".

Pennesi, l'investigateur de l'essai, a déclaré que l'acuité visuelle de la patiente était toujours inférieure au niveau de cécité légale, mais a noté que "c'est une grande amélioration."

Les deux patients suivants, qui ont reçu une dose moyenne d'EDIT-101, n'ont cependant pas connu un effet aussi prononcé. Le second a vu sa sensibilité rétinienne s'améliorer mais n'a pas connu de changement significatif de son acuité visuelle. Les résultats au cours des trois premiers mois pour le troisième patient étaient "indéterminés", a déclaré Editas dans sa présentation.

Le suivi a été moindre pour ces deux-là, à cinq et trois mois respectivement. Les Drs Pierce et Pennesi ont tous deux suggéré que les bénéfices pourraient s'accroître avec le temps.

"Nous savons avec ces thérapies que même lorsque vous améliorez physiologiquement la rétine, il faut parfois du temps pour que le cerveau utilise cette vision", a déclaré Pennesi.

Un quatrième patient a également été traité dans le groupe à dose moyenne mais n'avait pas été suivi pendant au moins trois mois au moment de la clôture des données. Le recrutement est en cours pour le groupe à forte dose, ainsi que pour une cohorte pédiatrique.(184)

Aucun traitement n'est disponible pour la dégénérescence rétinienne liée au CEP290. Mais une autre société, *ProQR Therapeutics*, développe un autre type de médicament génétique pour la traiter et a obtenu des résultats préliminaires encourageants(185). Les données d'une étude de stade avancé sont attendues au cours du premier semestre de l'année prochaine.

Conclusion :

Bien que cet essai clinique de CRISPR-Cas9 sur des humains ne soit pas le premier en son genre, il représentera un pas de plus dans le domaine de la thérapie génique pour combattre les maladies héréditaires, bien que de nombreuses questions économiques et éthiques resteront toujours d'actualité.

LES ASPECTS ÉCONOMIQUES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

6. LES ASPECTS ECONOMIQUES DE LA THERAPIE GENIQUE :

L'idée de réécrire l'ADN d'une personne n'est plus de l'ordre du rêve et devient clairement une réalité clinique pour plusieurs milliers de patients. Dans cette partie on va pouvoir explorer l'économie et le marché actuel de la thérapie génique, nous évaluerons la maturité du marché en faisant une mise au point sur les produits commercialisés et sur les laboratoires développant ces technologies. Enfin nous allons étudier les différents challenges et limites liés à la production qui font que le coût de ces produits soit extrêmement élevé.

6.1. Produits commercialisés :

Avant de débiter l'état des lieux du marché de la thérapie génique, on étudiera quelques produits disponibles actuellement sur le marché mondial. Nous allons nous intéresser plus précisément aux produits de thérapie génique par transfert de gène in vivo.

6.1.1. Neovasculgen®

Le Neovasculgen® DCI : Cambiogenplasmid est un produit de thérapie génique in vivo commercialisé uniquement en Russie. Indiqué dans le traitement de la maladie artérielle périphérique connue autrement sous le nom de *Peripheral Arterial Disease* durant laquelle le flux sanguin vers les membres est réduit à cause du rétrécissement des artères.(186)

Il délivre le gène codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Neovasculogen est un plasmide codant pour le promoteur CMV et la forme de 165 acides aminés du VEGF. Il a été mis au point par l'Institut des cellules souches humaines (HSCI) en Russie et approuvé en 2011(187).

6.1.2. Imlytic®

Imlytic ou Talimogene laherparepvec est un virus *Herpes simplex* de type 1 atténué (HSV-1) produit par délétion fonctionnelle de deux gènes (*ICP34.5* et *ICP47*) et insertion de la séquence codant le facteur humain stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF). Le talimogene laherparepvec est produit dans des cellules Vero par la technique de l'ADN recombinant.

Il est indiqué en oncologie dans le traitement du mélanome en se répliquant sélectivement dans les cellules tumorales, induisant ainsi une lyse de celles-ci.(188)

6.1.3. Gendicine®

Gendicine (adénovirus p53 humain recombinant), développé par Shenzhen SiBiono GeneTech Co. Ltd, a été approuvé en 2003 par la China Food and Drug Administration (CFDA) en tant que premier produit de thérapie génique de sa catégorie pour le traitement du cancer de la tête et du cou, et est entré sur le marché commercial en 2004. Gendicine est une thérapie biologique qui est administrée par injection intratumorale peu invasive, ainsi que par perfusion intracavitaire ou intravasculaire. La protéine p53 de type sauvage (wt) exprimée par les cellules transduites par la Gendicine est un suppresseur de tumeur qui est activé par le stress cellulaire, et médié par l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, ou induit l'apoptose, la sénescence, et/ou l'autophagie, selon les conditions de stress cellulaire(189).

6.1.4. Luxturna®

Luxturna ou Voretigene neparvovec est un traitement par thérapie génique pour une forme de dystrophie rétinienne héréditaire, commercialisé par Novartis, est autorisé en France depuis le mois d'avril 2019. Le Luxturna est un traitement pour les adultes et les enfants présentant une perte visuelle due à une dystrophie rétinienne héréditaire résultant de mutations bi-alléliques confirmées du gène RPE65. Premier traitement lancé sur le marché en France et en Europe pour cette maladie orpheline rétinienne, la protéine RPE65 permet la régénération du pigment visuel en convertissant le rétinol-trans en 11-cis-rétinol.

Il s'agit d'une thérapie génique développée par la société Spark Therapeutics. Sa mise à disposition en Europe est assurée par le laboratoire NOVARTIS(190).

6.1.5. Oncorine®

Le premier produit à base de virus oncolytique commercialisé dans le monde, Oncorine (H101), développé par Shanghai Sunway Biotech Co., Ltd depuis 1999, a été approuvé par la SFDA chinoise en novembre 2005 pour le carcinome nasopharyngé en combinaison avec la chimiothérapie après l'essai clinique de phase III, et a finalement obtenu le certificat GMP en août 2006. Les modifications génétiques de l'adénovirus font qu'il se réplique sélectivement

dans les cellules cancéreuses sans pouvoir se répliquer dans les cellules saines ; cette cytotoxicité sélective des adénovirus pour les cellules cancéreuses conduit à une lyse cellulaire(191).

6.1.6. Glybera®

Du fait de son rapport bénéfice-risque peu favorable, ce produit n'est plus commercialisé en Europe et son AMM n'a pas été renouvelé après son expiration le 25 Octobre 2017. Glybera ou Alipogene tiparvovec était indiqué dans le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase (LPLD). C'est un AAV vecteur du gène de l'enzyme lipoprotéine lipase LPL, nécessaire pour éliminer les grosses particules graisseuses qui, lorsqu'elles s'accumulent dans le sang, peuvent obstruer les vaisseaux sanguins(192).

6.1.7. Zolgensma®

Il a été approuvé le 24 mai 2019 aux États-Unis par la FDA. Zolgensma® (Onasemnogene abeparvovec) est une thérapie génique basée sur un vecteur viral adeno-associé (AAV) transportant le gène SMN1.

Zolgensma® est indiqué dans le traitement de l'amyotrophie musculaire spinale (SMA) chez les enfants de moins de 2 ans atteints de mutations bi-alléliques du gène SMN1 entraînant une expression insuffisante de la protéine SMN. Il s'agit d'une maladie rare, d'origine génétique, qui touche les cellules nerveuses qui commandent les muscles, appelées les motoneurones. Le produit agit comme activateur de la protéine du SMN. Le traitement va coûter 2,125 millions de dollars et le médicament est administré en une seule perfusion sur une heure. Cela fait de ce médicament le plus coûteux jamais commercialisé.

Le produit a été développé par la société AveXis qui a été rachetée par Novartis pour 8,7 milliards de dollars et qui est donc actuellement une filiale du géant suisse(193).

6.1.8. Lumevoq®

Le produit est un vecteur de type AAV codant pour la protéine ND4 humaine sauvage et il est indiqué pour le traitement de la perte de vision due à une Neuropathie Optique Héritaire de Leber (NOHL) causée par une mutation G11778A confirmée dans le gène

mitochondrial ND4. Sa demande d'Autorisation de Mise sur le Marché est actuellement en cours d'examen par l'Agence Européenne des Médicaments, avec une décision attendue au premier semestre 2022(194).

6.2. Le marché des produits de thérapie cellulaire et génique : Autorisations, abandons et coûts :

6.2.1. Autorisations :

Les systèmes de soins de santé du monde entier en sont aux premiers stades de l'application de la thérapie cellulaire et génique dans la pratique clinique. Le premier produit de thérapie cellulaire a été autorisé en Corée du Sud en 2001 et la première thérapie génique en Chine 2003. À la fin de 2018, 48 nouveaux produits de thérapie cellulaire et de thérapie génique étaient autorisés dans le monde, la plupart dans les économies développées.

La Corée du Sud a ouvert la voie en matière de développement et de commercialisation de nouvelles thérapies cellulaires et d'ingénierie tissulaire, avec 21 nouveaux produits à la clé. Cependant, seule une petite fraction de ces produits coréens a été commercialisée dans d'autres pays, alors qu'aucun des produits chinois n'a été commercialisé dans d'autres pays. La Corée du Sud a été le premier pays à avoir autorisé des produits d'ingénierie tissulaire. La première autorisation d'une thérapie cellulaire et d'une thérapie génique dans les économies développées a eu lieu en Europe en 2009 et 2012, respectivement. À la fin de la période d'analyse, l'UE était le leader, et les États-Unis le deuxième, en nombre de produits de thérapie génique et d'autorisations. Le succès de l'UE dans le domaine de la thérapie génique s'explique par le fait que l'UE compte 28 pays membres, dont des pays dotés d'une industrie pharmaceutique innovante très développée comme la France, l'Allemagne et le Royaume-Uni.

Il existe des différences importantes dans la réglementation de la thérapie cellulaire et génique au sein des organismes de réglementation du monde entier. Des études antérieures ont montré que les différences dans la réglementation des médicaments avaient entraîné des différences dans les caractéristiques des médicaments approuvés par les différents organismes de réglementation(195). Une étude publiée en 2019(196) a révélé des différences dans la classification des thérapies, la désignation de médicament orphelin, les procédures d'examen

et les indications d'utilisation qui pourraient entraîner des différences dans la pratique clinique dans différents pays. Les différences dans la définition, la portée et la réglementation des produits de thérapie cellulaire et génique pourraient être atténuées en améliorant les efforts d'harmonisation de la réglementation internationale.

A l'heure actuelle, les produits de la thérapie génique sont peu présents sur le marché et ceux qui le sont, le sont depuis peu. Cela explique que le marché de la thérapie génique est actuellement relativement faible. En revanche nous observons une réelle accélération du nombre de produits commercialisés depuis 5 ans. Cette dernière devrait connaître une croissance explosive dans les années à venir. Selon une étude menée par la multinationale britannique de consulting Deloitte, le marché de la thérapie génique in vivo devrait croître et les ventes cumulées devraient atteindre 4 milliards de dollars en 2024(197).

Le nombre relativement important d'autorisations pour la thérapie génique est lié à la nécessité d'étendre les marchés nationaux avec un petit nombre de patients et au coût élevé associé au développement clinique de la thérapie génique.

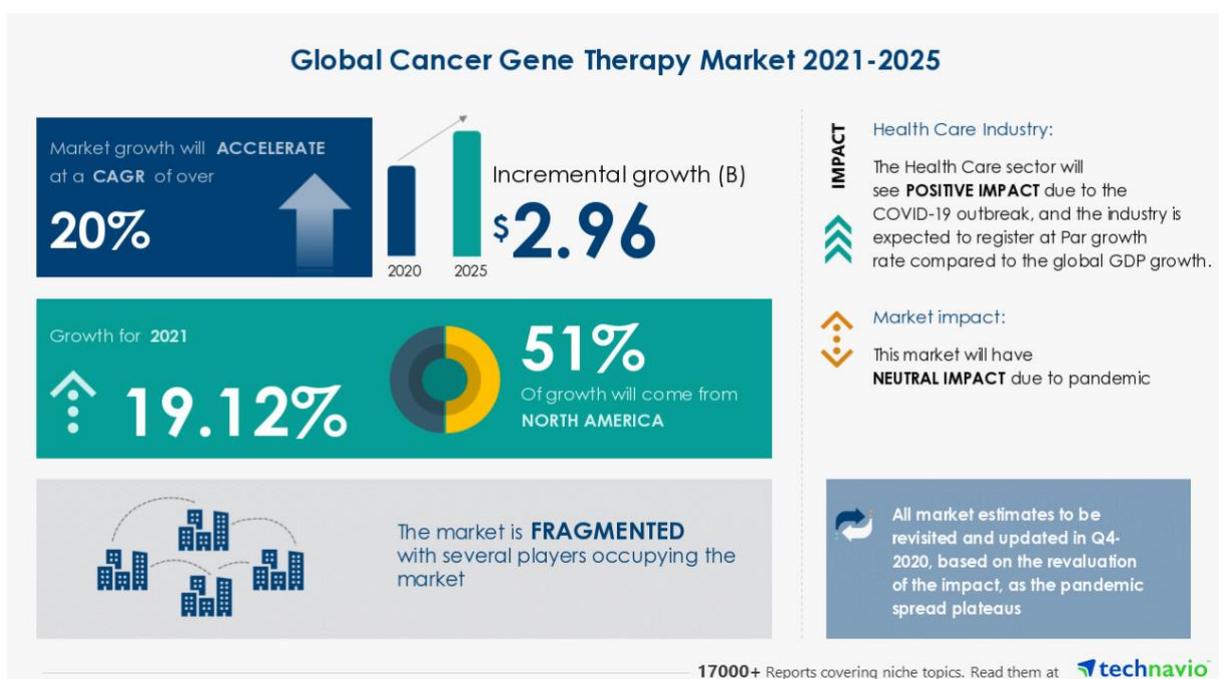


Fig. 31 : Estimation de la croissance du marché de la thérapie génique en oncologie 2021-2025 : une croissance estimée à 20% (198)

6.2.2. Abandons :

Les abandons du marché des produits de thérapie cellulaire et génique sont liés à des raisons commerciales. Les thérapies cellulaires et géniques ont un prix très élevé (199,200), ce qui rend difficile la prise en charge de ces produits par les systèmes de santé publics et privés(201,202). Alipogene tiparvovec, ou comme vu précédemment **GLYBERA®**, a été retiré du marché en 2017 après que les agences d'évaluation des technologies de la santé d'Allemagne et de France ont rejeté la prise en charge par l'assurance maladie publique de cette thérapie indiquée pour le déficit en lipoprotéine lipase, une maladie ultra rare en Europe(203,204). Et le produit n'a été évalué pour une prise en charge par l'assurance maladie publique dans aucun autre pays européen. Les systèmes de soins de santé ne sont pas prêts pour le remboursement de traitements très coûteux qui pourraient être nécessaires pour des millions de patients dans un avenir immédiat.

Les thérapies cellulaires et les thérapies géniques ont suscité une grande attention de la part des scientifiques et du public, mais elles passent relativement lentement du stade de la recherche à celui de l'autorisation de la pratique clinique. Cela a conduit à l'augmentation du nombre de cliniques offrant des traitements non autorisés à des patients gravement malades cherchant un accès immédiat à des interventions susceptibles de leur sauver la vie et à des interventions cosmétiques à haut risque pouvant causer des dommages irréparables aux patients(205,206)

6.2.3. Coûts :

Les thérapies cellulaires et géniques ont des prix parmi les plus élevés des thérapies dans le système de santé. Avec des coûts allant de 65 000 dollars à plus d'un million de dollars (alipogène tiparvovec). Cela reflète l'investissement initial dans une nouvelle technologie et le nombre très réduit de patients pour les premières thérapies. Les coûts des traitements individuels devraient diminuer au fur et à mesure que d'autres thérapies arrivent sur le marché et que des maladies plus courantes sont ciblées(207), bien que l'impact budgétaire potentiel d'un traitement de thérapie génique pour des maladies très répandues puisse être considérable. L'impact budgétaire des médicaments de thérapie innovante pour l'insuffisance cardiaque a été estimé à 348 milliards d'euros(208) et celui de la maladie d'Alzheimer à 72 milliards de livres sterling(209).

La combinaison de prix élevés et de données limitées sur la sécurité et l'efficacité des thérapies cellulaires et géniques constitue un obstacle important au remboursement par les payeurs publics et privés. Quatre thérapies cellulaires et géniques ont été retirées du marché européen après un refus de remboursement par les payeurs de soins de santé publics.

Ce travail a révélé une grande variabilité des prix dans le monde, les États-Unis affichant des prix plus élevés que le reste des pays. Le rapport coût-efficacité des thérapies cellulaires et géniques est difficile à appréhender, ce qui rend difficile de décider du remboursement approprié de ces thérapies. La plupart des thérapies cellulaires et géniques ont été approuvées à l'aide de systèmes d'autorisation conditionnelle qui permettent de commercialiser des traitements dont la sécurité et l'efficacité sont limitées et qui peuvent nécessiter des années pour démontrer leur sécurité et leur efficacité totales(210,211).

De plus, la plupart des thérapies géniques sont des médicaments orphelins pour des maladies rares et les médicaments orphelins sont généralement remboursés à des prix plus élevés que les médicaments pour des conditions plus communes(212). L'expansion de l'utilisation des thérapies cellulaires et géniques nécessitera une décision difficile quant aux traitements à couvrir, en particulier lorsque l'autorisation prévue des thérapies cellulaires et géniques pour les maladies chroniques communes qui ont une grande population de patients.

6.2.4. Conclusion :

Un nombre important de nouvelles thérapies cellulaires, tissulaires et géniques ont été approuvées au cours de la dernière décennie. La plupart des produits étaient autorisés sous conditions et ciblaient des cancers rares, des maladies génétiques et d'autres maladies débilitantes. Cependant, il existe également des produits approuvés pour des raisons esthétiques. La Corée du Sud et la Chine sont en tête des premières autorisations de thérapies cellulaires et géniques, respectivement, dans le monde. Les autorisations dans l'UE et aux États-Unis ont eu lieu principalement après 2010, et à la fin de 2018, ils deviennent les leaders de la thérapie génique et cellulaire. Les thérapies cellulaires, tissulaires et géniques font partie des thérapies les plus coûteuses. Les systèmes de soins de santé ne sont pas prêts à assumer le coût du développement de ces thérapies pour une myriade de maladies rares et de maladies plus courantes de proportions épidémiques.

6.3. Laboratoires développant les thérapies géniques :

En effet, le marché de la thérapie génique est un marché naissant, toujours en voie de croissance, c'est ce qui explique l'absence de Big Pharma dans le développement de ce type de produits ; elles ne possèdent pas d'outils ou de compétences en interne. Comme on a conclu depuis les parties précédentes de notre travail, la thérapie génique provient de travaux de recherche intenses et d'innovations, qui plus tard ont donné naissance à des Start-ups Biotech devenus leaders dans la production des thérapies géniques.

Parmi les organisations qui développent des produits biotechnologiques, seulement 4,5% sont des grandes sociétés pharmaceutiques (définies comme de grandes sociétés pharmaceutiques comptant 50 000 employés ou plus) (213) (figure 32). Cette représentation relativement faible met en évidence l'entrée tardive de nombreuses grandes sociétés pharmaceutiques dans le domaine des technologies génériques, aggravée par une réticence à rendre publics les programmes internes avant le début des études cliniques. Au lieu de cela, les sociétés de biotechnologie ont tendance à s'associer directement avec les grandes entreprises pharmaceutiques, ce qui pourrait également témoigner de l'approche plus prudente adoptée par les grandes entreprises pharmaceutiques à l'égard des technologies génériques. La récente vague d'acquisitions de sociétés de biotechnologie de thérapie génique suggère un changement de stratégie de la part de certaines grandes sociétés pharmaceutiques.

L'industrie parraine environ 77% des essais cliniques(213). La prévalence des essais cliniques industriels reflète peut-être les difficultés rencontrées par les chercheurs qui font passer des thérapie géniques expérimentales à la clinique, un passage notoirement surnommé la vallée de la mort aux États-Unis(214), un terme qui pourrait être appliqué dans le monde entier. En effet, le passage de la validation préclinique aux études cliniques nécessite un financement important pour couvrir les dépenses, telles que les études toxicologiques formelles sur les animaux, la fabrication de matériel de qualité clinique et de réactifs conformes aux bonnes pratiques de fabrication (BPF), la préparation des documents réglementaires et les coûts sur les sites des essais cliniques(215). Bien que les agences gouvernementales tentent de répondre à la demande de l'essai clinique(216), la réalité est que la plupart des groupes universitaires sont ralentis par un manque de financement avant de

tenter l'essai clinique en question. Pour autant que les groupes universitaires aient obtenu des droits de propriété intellectuelle (PI) pour permettre la commercialisation de leurs découvertes, une option leur permettant d'obtenir un financement clinique est de se tourner vers le financement par capital-risque en créant des sociétés de biotechnologie avant de passer à la FTIH (First Time In Human)(217). C'est ce qui s'est passé au moins aux États-Unis et plus récemment dans d'autres pays, comme la Chine(218). Ces investissements indispensables permettent de lancer efficacement le développement clinique.

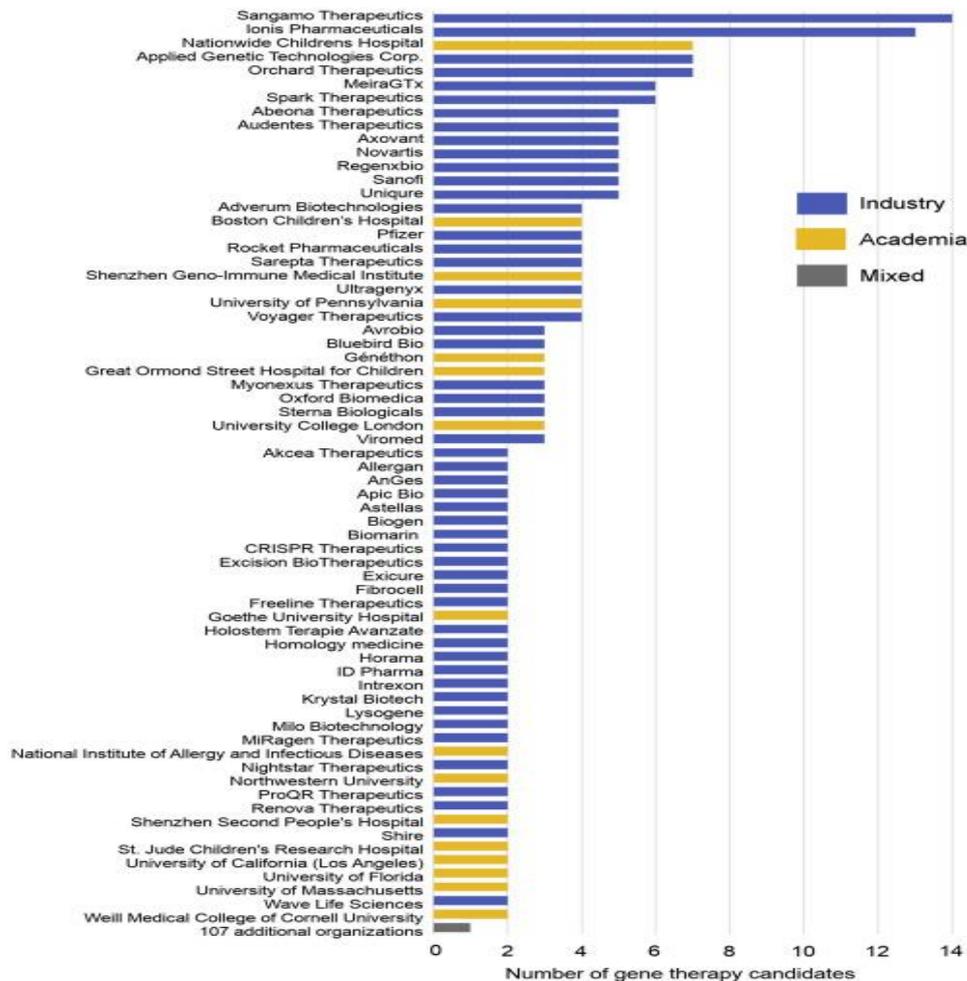


Fig. 32 : L'analyse du marché des principaux acteurs du pipeline de thérapie génique en phase clinique précoce(213)

Comme nous l'avons vu plus haut, les médicaments de thérapie génique commercialisés sont parfois le fruit de partenariat entre Biotech et BigPharma.

Les BigPharma agissent donc soit par rachat, soit par partenariat avec les Biotech.

Les principaux rachats sont :

- De Kite Pharma par Gilead pour 11,9 milliards de dollars (219)
- De Juno therapeutics par Celgene pour 9 milliards de dollars (220)
- D'AveXis par Novartis pour 8,7 milliards de dollars (221)
- D'Audentes therapeutics par Astellas pour 3 milliards de dollars (222)

Les principaux partenariats sont :

- Spark therapeutics et Novartis (223)
- Pfizer et Cellectis (224)

La thérapie génique s'appuie sur des technologies récentes et innovatrices. Le rapprochement des Big Pharma des Biotech voire des entités académiques se révèle nécessaire pour le développement de ce type de produits.

Nous avons donc étudié de manière précise le marché actuel de la thérapie génique in vivo. Nous avons vu qu'il s'agit d'un marché encore jeune mais en plein développement et prospérité. Cette croissance très rapide, coïncide avec l'apparition de challenges à dépasser face aux laboratoires.

La partie suivante sera donc dédiée aux limites auxquelles font face les sociétés de thérapie génique.

6.4. Challenges face à la production des thérapies géniques :

Pour comprendre la réalité de ces challenges il faudra d'abord comprendre les étapes de production d'un produit de thérapie génique. La bioproduction (production d'un médicament d'origine biologique) est généralement découpée en quatre grandes phases :

• Préparation des matières premières :

Tout d'abord, trois composants sont assemblés dans le vecteur de thérapie génique : le génome du vecteur, la protéine AAV et les protéines auxiliaires. Ils sont combinés en une "enveloppe" appelée capsid, qui servira de "véhicule" pour transporter une "cargaison" de gènes fonctionnels dans les cellules.

• **Processus en amont-Upstream Process :**

Les capsides seront assemblées et intégrées à un virus inerte, créant ainsi le vecteur viral. Des cellules spéciales sont utilisées comme "hôtes" du vecteur viral, lui permettant de se reproduire et d'atteindre la concentration requise pour la récolte.

• **Processus en aval-Downstream Process :**

À ce stade, le vecteur viral est traité pour le purifier et éliminer les matières non essentielles. Ensuite, il sera examiné et testé pour s'assurer de son bon fonctionnement.

• **Achèvement et conditionnement :**

Enfin, le vecteur viral sera traité et conditionné pour être envoyé en vue d'une utilisation clinique.

6.4.1. Upstream

Compte tenu du temps et des efforts considérables que les entreprises ont investis dans la thérapie génique, la plupart d'entre elles préfèrent jouer la carte de la sécurité en matière de fabrication. Par conséquent, la grande majorité des thérapies basées sur le virus adéno-associé recombinant (VAAr) - qui représentent la plupart des thérapies géniques - sont encore produites à l'aide d'une méthode mise au point il y a plus de vingt ans, connue sous le nom de technique de "triple transfection".

L'un des principaux défis de la production de rAAV est la nécessité d'un "virus auxiliaire" pour faciliter la réplication dans une cellule mammalienne hôte. Dans les premiers temps de la production de rAAV, les cellules cultivées étaient d'abord infectées par un adénovirus, puis elles étaient transfectées avec deux plasmides d'ADN :

- l'un contenant une paire de gènes essentiels du rAAV
- l'autre une séquence à utiliser pour la thérapie génique en question.

Cette approche permet d'obtenir une quantité raisonnable de particules de rAAV entièrement assemblées et prêtes pour la thérapie génique. Cependant, celles-ci doivent ensuite être séparées des particules d'adénovirus également abondantes qui contaminent la préparation virale obtenue et peuvent mettre les patients en danger.

En 1998, deux groupes de recherche différents - l'un dirigé par R. Jude Samulski à l'université de Caroline du Nord (225) et l'autre par Peter Colosi chez Avigen (226)- ont déterminé qu'ils pouvaient éviter ces problèmes en transférant les fonctions clés de l'adénovirus sur un troisième plasmide "auxiliaire". Dans cette approche, les chercheurs peuvent simplement transfecter leur cellule hôte préférée - dans la plupart des cas, des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK) 293 - avec les trois plasmides selon une procédure par étapes(227) (figure 32). L'activité combinée des gènes dérivés de l'adénovirus sur le plasmide auxiliaire et des gènes du rAAV sur le deuxième plasmide s'est avérée suffisante pour générer des particules de rAAV fonctionnelles contenant le transgène du troisième plasmide.

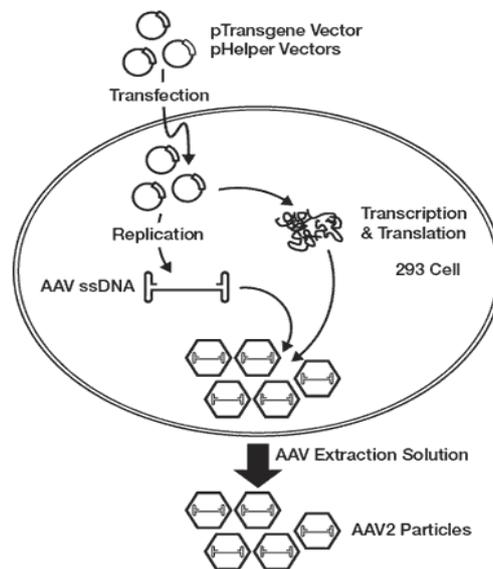


Fig. 33 : Principe de productions du vecteur AAV par transfection(228)

Outre l'élimination des adénovirus indésirables, cette procédure présente plusieurs avantages. Il existe de nombreux sérotypes différents de rAAV avec des propriétés distinctes et la capacité d'infecter différents organes humains, et les chercheurs peuvent facilement échanger différents éléments génétiques dans ce système de manière modulaire pour déterminer le virus généré. En outre, les procédures de transfection utilisées pour délivrer les trois plasmides aux cellules sont robustes, bien établies et peuvent être réalisées à l'échelle industrielle.

Aujourd'hui, au moins 11 sociétés produisent des thérapies expérimentales ou cliniquement approuvées à base de rAAV en utilisant cette approche, y compris Luxturna de Spark Therapeutics et deux autres thérapies actuellement en phase 3 d'essais d'Avexis et de Gensight. De nombreux fabricants sous contrat, tels que Vigene Biosciences, adoptent également cette approche, qui peut être mise à l'échelle de manière routinière pour générer des cultures HEK293 dans des volumes allant jusqu'à 500L par bioréacteur, générant des rAAV à un rendement de 105 génomes viraux par cellule(228).

La plus grande limite de cette approche ? C'est l'évolutivité. Les cellules HEK293 sont généralement maintenues dans des cultures adhérentes, mais des volumes de culture bien plus importants sont possibles avec des cellules flottant librement en suspension. Pour résoudre ce problème, de nombreuses équipes ont mis au point diverses stratégies pour produire des cultures en suspension de cellules HEK293 triplement transfectées. Les résultats publiés ont d'abord démontré une productivité équivalente à celle de la culture adhérente dans un volume de 20 litres, mais en principe, ils pourraient être portés à des volumes de culture de 200 litres ou plus pour atteindre une productivité bien plus élevée en matière de rAAV.

La technologie de triple transfection a permis le lancement commercial de la thérapie génique à base de rAAV pour les patients atteints de maladies oculaires aux États-Unis. Malgré l'apparition de nouveaux systèmes plus efficaces, il est presque certain que cette approche restera déterminante pour la fabrication de thérapies géniques pour les maladies rares ainsi que pour le matériel destiné aux essais cliniques de validation de concept.

6.4.2. Downstream

Dans cette phase l'objectif principal est de séparer les impuretés produites par le traitement du virus au préalable et obtenir des adénovirus dans un état convenable à la formulation et l'administration chez les patients. Donc le résultat de cette étape doit être un produit pur, sûr et sécurisé tout en garantissant l'absence de perte en rendement de production.

De nombreux vecteurs sont sécrétés dans le milieu. Dans ce cas, le virus peut être recueilli dans le milieu, ce qui réduit considérablement la charge en aval. Dans certains cas, une partie du virus reste dans les cellules et, par conséquent, la lyse cellulaire avec un détergent ou des moyens physiques peut être essentielle pour améliorer le rendement. Il existe une grande variété de procédés pouvant être utilisés pour la purification, notamment la clarification par filtration ou centrifugation ; les étapes de chromatographie par affinité, échange d'ions, encollage, résines multimodales et autres ; les étapes de concentration par TFF ou ultracentrifugation ; et les traitements enzymatiques pour réduire les acides nucléiques. Lorsque les cellules doivent être lysées pour libérer les produits du vecteur, plusieurs étapes peuvent être nécessaires pour optimiser la purification.

Le choix du processus de production en amont (upstream) peut affecter la charge de purification en aval (downstream). Par exemple, les forces de cisaillement exercées sur les cellules adhérentes sur des systèmes de microcarriers ou d'autres systèmes à mouvement fluide peuvent augmenter les débris cellulaires. Un autre exemple est qu'un bioréacteur à lit fixe peut parfois offrir un certain avantage : certaines impuretés peuvent être piégées dans le lit.

Les étapes traditionnelles de purification reposaient sur l'ultracentrifugation, la floculation et d'autres technologies difficiles à mettre en œuvre. Des progrès récents ont permis d'obtenir le même niveau d'élimination des impuretés en utilisant la chromatographie et la filtration à flux tangentiel, qui sont des techniques très faciles à mettre à l'échelle.

Malgré le besoin permanent d'améliorer la production de vecteurs thérapeutiques, l'avenir de la thérapie génique à base de virus suscite beaucoup d'optimisme. À l'avenir, la thérapie génique basée sur les vecteurs pourrait non seulement offrir le remplacement de gènes, mais aussi des fonctions d'édition de gènes.

LE PAYSAGE ÉTHIQUE ET POLITIQUE DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

7. LE PAYSAGE ETHIQUE ET POLITIQUE DE LA THERAPIE GENIQUE :

“Whether the fruits of the Human Genome Project are sweet or bitter depends largely on how successful we are in dealing with the ethical issues it raises. . . It is our duty to begin the era of genetic engineering in as responsible a manner as possible” – Anderson WF(229)

Comme la thérapie génique consiste à modifier les instructions de base de l'organisme, elle soulève de nombreuses questions éthiques particulières sur la valeur de la vie humaine, l'eugénisme et le poids des conséquences involontaires, CRISPR a également vu le jour dans un paysage politique très différent de celui du début des années 80, lorsque la bioéthique était le dernier grand sujet de controverse politique. Pourtant, aujourd'hui, malgré le fait que de nouveaux développements comme l'édition de gènes soient en plein essor et que les défis aux conceptions traditionnelles de la reproduction humaine soient toujours en développement, les questions éthiques de la biotechnologie sont largement répandues dans le monde :

- Comment distinguer les "bonnes" et les "mauvaises" utilisations de la thérapie génique ?
- Qui décide quels traits sont normaux et lesquels constituent un handicap ou un trouble ?
- Le coût élevé de la thérapie génique la rendra-t-elle accessible uniquement aux riches ?
- L'utilisation généralisée de la thérapie génique pourrait-elle rendre la société moins tolérante envers les personnes différentes ?
- Devrait-on autoriser l'utilisation de la thérapie génique pour améliorer des caractéristiques humaines fondamentales telles que la taille, l'intelligence ou les capacités athlétiques ?

7.1. L'édition de la lignée germinale par CRISPR/Cas9 et les modifications héréditaires

La recherche actuelle sur la thérapie génique se concentre sur le traitement des individus en ciblant la thérapie sur les cellules du corps, comme la moelle osseuse ou les cellules sanguines. Ce type de thérapie génique ne peut être transmis aux enfants d'une personne. La thérapie génique pourrait toutefois être ciblée sur les ovules et les spermatozoïdes (cellules germinales), ce qui permettrait de transmettre le gène inséré aux générations futures. Cette approche est connue sous le nom de thérapie génique germinale.

L'idée de la thérapie génique germinale est controversée. Bien qu'elle puisse éviter aux générations futures d'une famille d'être atteintes d'une maladie génétique particulière, elle pourrait affecter le développement d'un fœtus de manière inattendue ou avoir des effets secondaires à long terme qui ne sont pas encore connus. Comme les personnes qui seraient touchées par la thérapie génique germinale ne sont pas encore nées, elles ne peuvent pas choisir de recevoir le traitement. En raison de ces préoccupations éthiques, le gouvernement américain n'autorise pas l'utilisation de fonds fédéraux pour la recherche sur la thérapie génique germinale chez l'homme.

L'édition génétique des cellules somatiques, abordée dans les sections précédentes, influence exclusivement les cellules dont le génome est modifié et, à ce titre, présente un risque minime d'affecter les générations futures. L'édition génétique de la lignée germinale (gamètes, zygotes et embryons) peut toutefois entraîner la propagation de la modification génétique dans toutes les cellules de l'individu édité. Les cellules reproductrices étant également touchées, les modifications génétiques introduites seraient transmises à la descendance de l'individu modifié (230).

Cette application de la thérapie génique a le potentiel d'éradiquer les maladies génétiques héréditaires. Cependant, des préoccupations sociales, éthiques et religieuses ont fait que la recherche sur l'édition des gènes de la lignée germinale humaine est strictement réglementée, tandis que les applications cliniques sont actuellement interdites dans plus de 50 pays dans le monde(231). Compte tenu du rythme auquel les technologies d'édition du génome évoluent, le monde scientifique a demandé un moratoire mondial sur les applications cliniques de ces technologies, jusqu'à ce qu'un cadre réglementaire complet soit mis en place pour assurer une surveillance stricte et une évaluation des risques et des avantages(232).

7.2. Conclusions de l'édition CRISPR/Cas9 sur des zygotes humains

Sur la base du nombre limité d'études qui ont exploré l'édition de la lignée germinale humaine par CRISPR/Cas9, il est évident que cette technologie en est encore à ses débuts. De plus, le potentiel prometteur de l'édition germinale CRISPR est actuellement limité par le manque de précision, les effets hors cible et le mosaïcisme embryonnaire.

Les études sur la lignée germinale qui ont eu lieu en Chine ont mis en évidence d'importants problèmes techniques liés à l'application de CRISPR/Cas9 sur des zygotes humains et ont souligné l'importance de poursuivre les recherches et de procéder à une délibération globale avant de tenter toute application clinique de cette technologie(233). Les travaux de Ma et de ses collègues étaient techniquement supérieurs aux précédents ; un nombre beaucoup plus important d'embryons a été analysé, des technologies plus sophistiquées ont été employées et les analyses effectuées étaient vraisemblablement plus étendues. Ces travaux ont été ouvertement critiqués sur la base de questions relatives à la faisabilité de la réparation et à l'adéquation des méthodes employées(234,235), mais Ma et ses collègues ont plus tard présenté de nouvelles données étayant davantage leurs affirmations(236).

On peut soutenir que l'application la plus réussie à ce jour de l'édition de la lignée germinale humaine par CRISPR/Cas9 a été réalisée lorsque la machinerie CRISPR/Cas9 a été co-injectée avec le sperme mutant pendant l'ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) par l'équipe de Ma (237). Il reste à déterminer si cette technologie serait aussi efficace en utilisant la combinaison inverse de gamètes (ovocyte mutant/spermatozoïde de type sauvage). Plus important encore, cette étude suggère que CRISPR/Cas9 peut être utilisé pour s'assurer que les embryons sont produits sans mutations, mais pas pour corriger les mutations dans les embryons établis (un mosaïcisme s'est produit dans tous les embryons qui ont été modifiés au stade du zygote(233,237,238)). En clinique, le diagnostic précède le traitement et, dans le cadre des techniques de procréation assistée (PMA), le diagnostic de l'embryon a lieu entre le 3^e et le 6^e jour après la fécondation(239), moment auquel CRISPR/Cas9 entraînerait inévitablement un mosaïcisme.

7.3. Considérations éthiques sur l'édition du génome

En considérant l'impact global de la technologie CRISPR/Cas9, Mulvihill et ses collègues ont fait valoir que : "La plus grande contribution de CRISPR sera certainement le rythme, la profondeur et le souffle des applications et des découvertes qu'elle permet "(240). Si l'on considère CRISPR sous l'angle de l'éthique, le développement de cette technologie n'a pas fondamentalement changé les questions éthiques entourant la thérapie génique et le génie génétique, si ce n'est peut-être qu'il a mis ces questions en avant pour une considération immédiate.

L'éthique des applications humaines de l'édition de gènes est largement discutée dans deux catégories, à savoir les modifications génétiques visant à corriger des gènes défectueux (thérapie génique), et les modifications qui se concentrent sur l'amélioration de gènes physiologiquement normaux (amélioration génétique) (241). La controverse éthique porte également sur le type de cellules qui sont modifiées génétiquement, somatiques ou germinales. La thérapie génique appliquée aux cellules somatiques est généralement considérée comme éthiquement saine, puisque les effets seraient limités à un seul patient et ne seraient pas transmis aux générations futures. Cependant, l'amélioration génétique des cellules somatiques et la thérapie génique ou l'amélioration génétique de la lignée germinale ne sont pas considérées comme des activités éthiques.

L'amélioration de la lignée germinale est généralement considérée comme immorale. En fait, l'article 24 de la Déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme, adoptée par la Conférence générale de l'Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture (UNESCO) en 1997, stipule que les modifications de la lignée germinale "pourraient être contraires à la dignité humaine "(242).

D'après la littérature actuelle sur le sujet, on peut diviser la controverse éthique de l'édition de gènes germinaux en trois concepts/dilemmes centraux(230,241,243), qui seront examinés ici individuellement :

1. "Nécessité de l'édition de gènes germinaux". On peut soutenir que la norme de soins en matière de procréation assistée qui utilise la FIV (Fécondation In Vitro) en combinaison

avec le DPI (Diagnostic Pré-Implantatoire) pour sélectionner des embryons sains est suffisante pour gérer la grande majorité des maladies monogéniques, à l'exception des parents qui sont tous deux homozygotes pour un gène récessif causant la maladie (c'est-à-dire la fibrose kystique ou la maladie de Tay-Sachs), ou lorsque l'un des parents est homozygote pour un gène dominant causant la maladie (c'est-à-dire la maladie de Huntington ou la maladie rénale polykystique)(241). En outre, le DPI n'est probablement pas utile dans le cas de maladies polygéniques courantes, notamment les maladies cardiaques, le diabète ou la maladie d'Alzheimer, et l'édition de gènes conventionnelle ne serait pas non plus applicable dans ces cas. La question de la nécessité de l'édition génétique germinale est également inextricablement liée au désir des parents d'avoir des enfants (sains) génétiquement apparentés. La question de savoir si ce désir de parenté génétique peut l'emporter sur les risques de l'édition de gènes germinaux, en particulier à une époque où l'adoption, les gamètes de donneurs et le mariage homosexuel deviennent des schémas familiaux de plus en plus courants, reste ouverte. À l'inverse, la thérapie de remplacement mitochondrial (TRM), qui est le seul exemple d'une application légalisée de l'édition de la lignée germinale, donne lieu à une progéniture qui est génétiquement liée à trois individus, le père, la mère et la donneuse de mitochondries/ovocytes énucléés. La TRM est utilisée pour guérir des maladies souvent dévastatrices qui découlent de mutations de l'ADN mitochondrial et qui sont transmises à l'embryon par l'ovocyte de la mère(244). À l'heure actuelle, la TRM n'est légale qu'au Royaume-Uni, bien que d'autres pays ayant des lois plus souples sur la modification génétique l'aient également appliquée(245). Les embryons femelles et mâles sont admissibles à la TRM, ce qui donne à penser qu'il s'agit d'une forme héréditaire de modification génétique, par le biais des embryons femelles traités par TRM1. Des inquiétudes ont également été soulevées quant au fait que le TRM pourrait constituer un " pied dans la porte " pour d'autres applications d'édition de gènes germinaux.

2. "les risques imprévisibles/non identifiés de l'édition de gènes germinaux" est le deuxième pilier de l'éthique de l'édition de gènes germinaux. Les principaux risques liés à la technologie CRISPR/Cas9 sont l'efficacité du ciblage, les effets hors cible et l'immunogénicité, comme nous l'avons vu précédemment. Selon Baltimore et ses collègues : "Comme pour toute stratégie thérapeutique, des risques plus élevés peuvent être tolérés

lorsque la récompense du succès est importante, mais ces risques exigent également une plus grande confiance dans leur efficacité probable "(232). L'édition CRISPR/Cas9 des cellules somatiques présente un grand potentiel de réussite et une amélioration constante de l'efficacité, qui l'emportent sur les risques associés. Mais dans le cas des modifications de la lignée germinale, il y a davantage de facteurs qui doivent être mis en balance avec les risques. Par la nature de la modification germinale, par exemple, il ne sera jamais possible d'obtenir le consentement éclairé des personnes directement concernées par l'application. Dans le même temps, la prise de décisions en matière de soins de santé pour les enfants est juridiquement et socialement saine, et le consentement éclairé des enfants n'est pas requis avant le traitement. Une autre question relative aux risques non identifiés de l'édition de gènes germinaux est de savoir qui porterait la responsabilité des applications qui affecteront les générations futures. Capecchi a précédemment déclaré que "quelles que soient les procédures que nous pourrions adopter pour l'édition de la lignée germinale humaine, elles devraient à tout le moins être réversibles ". Il s'agit d'un concept séduisant, même s'il n'est peut-être pas encore techniquement réalisable.

3. "Pente glissante" est l'hypothèse qui existe depuis la conception de la thérapie génique soutient l'existence d'une pente dans l'édition génétique de la lignée germinale. Cette hypothèse fait référence à l'utilisation potentielle des technologies d'édition de gènes à des fins eugéniques, et se fonde sur la démarcation peu claire entre thérapie et amélioration. Cette théorie est généralement considérée comme farfelue par les scientifiques ; les traits désirables tels que l'intelligence, la confiance, la sociabilité ou même l'apparence physique sont complexes, polygéniques et sont souvent influencés par l'environnement (246). Cependant, la simplicité et l'efficacité de la technologie CRISPR/Cas9 ont déjà donné des résultats d'amélioration génétique chez des animaux de recherche, d'élevage et de compagnie (247,248). Des porcs (figure 34) édités par CRISPR/Cas9 ont été conçus pour être résistants aux infections virales(249), posséder une meilleure capacité thermogénique et accumuler moins de masse grasse, ou même comme des porcs miniatures fantaisie.



Fig. 34 : Couverture de la revue Science en 2017 révélant les porcs miniatures (Tea cup piglets) édités par CRISPR-cas9 (250)

Des beagles modifiés par CRISPR/Cas9 et dépourvus d'expression de la Myostatine (figure 35) ont obtenu une masse musculaire deux fois supérieure à celle de leurs congénères non modifiés. Il est intéressant de noter que l'inhibition de la MYOSTATINE par des anticorps monoclonaux a fait l'objet d'essais cliniques de phase 2 (NCT02310763) pour le traitement de la DMD92. Il n'est pas impossible que l'on passe de la thérapie de la myopathie à l'amélioration de l'athlète.



Fig. 35 : Deux Beagles Deux beagles, Hercules (à gauche) et Tianguo (à droite), sont les premiers chiens dont un gène a été modifié à l'aide d'un outil appelé CRISPR/Cas9. Les chercheurs ont muté les gènes de la myostatine des chiens afin d'augmenter la quantité de muscle produite par les beagles(251).

CONCLUSION

La réaffectation d'un ancien mécanisme du système immunitaire a fourni aux chercheurs l'outil d'édition de gènes le plus puissant mis au point à ce jour ; la possibilité de modifier les génomes avec une précision chirurgicale n'a jamais été aussi facile et la possibilité de guérir les maladies génétiques n'a jamais été aussi proche de la réalité. Cependant, le rythme accéléré auquel les technologies CRISPR/Cas9 ont évolué rend nécessaire une délibération permanente pour garantir la sécurité, l'efficacité et l'adhésion aux valeurs morales des applications associées. Des discussions réfléchies et inclusives favoriseront l'élaboration de lignes directrices et de cadres réglementaires qui pourront nous aider à exploiter l'énorme potentiel de la technologie CRISPR/Cas9 tout en minimisant les risques prévisibles de son éventuelle mauvaise utilisation.

BIOHACKERS : L'USAGE DÉTOURNÉ DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

8. BIOHACKERS : L'USAGE DETOURNE DE LA THERAPIE GENIQUE

Le "biohacking" est devenu un phénomène culturel et scientifique. Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur la définition précise du "biohacking", le terme décrit généralement des recherches et des interventions biologiques menées en dehors des cadres scientifiques institutionnels par des personnes qui n'ont pas forcément une formation scientifique traditionnelle (252). L'accès plus facile aux informations et aux ressources biologiques a permis au biohacking de se développer. Ses participants décrivent souvent leurs activités comme étant motivées par la croyance en un droit de "faire de la science", une grande valeur accordée à l'autonomie corporelle et l'idée que les institutions et réglementations scientifiques traditionnelles ont systématiquement échoué à profiter à la société(253) . Il est difficile de quantifier le nombre d'individus dans le monde qui participent au biohacking, étant donné les désaccords sur ce qui est considéré comme du biohacking, le flux constant d'individus entrant et sortant des communautés de biohacking et la nature décentralisée de ces communautés. Selon une estimation, les groupes Google de DIYbio comptaient plus de 5 000 membres au début de 2020. Selon une autre estimation, un rapport de 2017 du Brookings Institute a estimé qu'il y avait 30 000 "enthousiastes, adeptes, biohackers et scientifiques citoyens" rien qu'aux États-Unis(254).

8.1. DIY Bio et laboratoires communautaires

CRISPR n'est pas seulement limité aux contextes traditionnels de laboratoire avec des scientifiques ayant une formation académique ou sur le terrain en tant que lecteur de gènes. Les laboratoires communautaires et les amateurs de DIY bio (également appelés "biohackers") utilisent cette technologie, dans de nombreux cas pour rendre la science biologique plus accessible à ceux qui ne fréquentent pas les milieux scientifiques traditionnels. Le DIY bio, un mouvement scientifique citoyen qui vise à mettre la science entre les mains du public, est un excellent exemple d'un nouveau marché pour CRISPR-Cas9. Les laboratoires DIY bio fonctionnent traditionnellement selon des exigences de confinement de faible biosécurité (niveau de biosécurité 1 ou 2), (255) travaillant principalement avec des

organismes non pathogènes ; la plupart d'entre eux effectuent des travaux qui nécessitent à peu près les mêmes niveaux de confinement que ceux d'un laboratoire de lycée. CRISPR-Cas9 leur fournit une méthode peu coûteuse pour produire des modifications génétiques rapides et leur offre une riche expérience d'apprentissage de la génétique. Les kits disponibles en ligne (figure 35) semblent s'adresser activement aux adeptes du bricolage biologique, dénigrant parfois les laboratoires scientifiques "traditionnels" à partir desquels cette technologie a été développée. L'une des entreprises les plus connues est Odin, fondée par Josiah Zayner(256) (figure 36), travaillait auparavant pour la NASA(257), est un partisan connu et controversé de la science citoyenne. La société de fournitures biotechnologiques de Zayner s'est développée ces dernières années pour inclure des kits permettant la manipulation génétique d'une grande variété d'organismes, y compris des plantes et des animaux. Un kit vendu sur le site est destiné à la modification génétique des grenouilles arboricoles, avec une insertion CRISPR qui augmente l'expression d'une hormone de croissance et, par conséquent, la taille des grenouilles(258).

Si ces kits et laboratoires peuvent contribuer à l'éducation scientifique du public et offrir de riches expériences d'apprentissage (et potentiellement, un espace pour les entrepreneurs en biotechnologie), il existe un potentiel d'abus - bien qu'à l'heure actuelle, il s'agisse surtout d'abus liés à l'automutilation. En 2017, la FDA a émis un avertissement contre la "thérapie génique auto-administrée" après que des biohackers aient tenté d'utiliser des kits CRISPR sur eux-mêmes. Le créateur du kit Odin, Josiah Zayner, a tenté de s'injecter une construction CRISPR afin d'augmenter sa musculature (259). Plus précisément, il a tenté de cibler et d'éliminer le gène de la myostatine, qui est le gène de la musculature inhiberait généralement la croissance des myoblastes, ou cellules musculaires (260). Chez les chèvres, il a été démontré que les knock-outs de la myostatine modifient le métabolisme et augmentent la masse musculaire (261). Un autre exemple de biohacker s'utilisant lui-même pour expérimenter est celui d'Aaron Traywick, qui s'est injecté un herpèsvirus ciblant CRISPR lors d'un événement diffusé sur Facebook (262). Traywick souffrait lui-même d'une infection à l'herpès, mais il essayait de démontrer à quel point CRISPR pouvait être utile pour traiter des maladies humaines courantes. Néanmoins, les tentatives des biohackers d'utiliser leur propre corps pour démontrer l'efficacité d'un produit semblent être un dangereux précédent pour les développeurs à l'avenir, et la FDA l'a publiquement décrié.



Fig. 36 : De gauche à droite : les kits CRISPR commercialisés par l'entreprise ODIN et son fondateur Josiah Zayner(256)

8.2. Le potentiel de préjudice

Alors que les outils CRISPR deviennent plus largement disponibles et applicables, il est possible que la technologie soit mal utilisée par un acteur individuel ou une organisation. CRISPR réduit considérablement les barrières de coût et d'expertise des méthodes antérieures d'édition de gènes. Les méthodes précédentes, comme l'édition du génome par ZFN, pouvaient coûter des milliers de dollars et ne sont actuellement disponibles que chez Sigma Aldrich(263) . Ces kits ZFN nécessitent une certaine expertise en laboratoire, ainsi que des lignées cellulaires ou des organismes isolés sur lesquels utiliser l'outil. Ils permettent aux chercheurs de concevoir des ZFN sur mesure pour des gènes d'intérêt, de les transformer dans une cellule d'intérêt et, en quelques jours, le ZFN commencera à modifier le gène. Selon le fabricant, seuls 1 à 20 % des cellules seront mutées, ce qui est un pourcentage plus faible qu'avec CRISPR. Cependant, les cellules mutées peuvent être récoltées en quelques semaines. Les ZFN ont été utilisés de manière extensive pendant des années, mais l'outil nécessitait souvent l'ajout de différentes enzymes ou exigeait des méthodes compliquées, comme des conditions de culture à froid, pour que l'expression du ZFN soit efficace (264). Cela diffère des kits CRISPR actuels, qui peuvent fournir E. coli comme organisme initial et nécessitent beaucoup moins de suppléments.

8.3. CRISPR entre démocratisation et potentiel danger de biosécurité

CRISPR bénéficie aujourd'hui d'un financement important pour des projets de recherche connexes, d'un succès dans une variété d'organismes et d'un coût relativement faible. Cela a permis la démocratisation de cet outil d'édition de gènes, qui est prometteur pour la recherche fondamentale et la santé publique. Cependant, sa grande disponibilité pourrait également en faire un outil attrayant pour un acteur malveillant. Avec de nombreuses entreprises vendant des réactifs CRISPR et une pléthore de littérature expliquant les méthodes CRISPR, les barrières à l'entrée de la recherche ont été abaissées pour les acteurs légitimes et illégitimes.

Le potentiel de CRISPR à révolutionner le génie génétique soulève également des inquiétudes quant à l'augmentation des menaces de biosécurité en abaissant les barrières pour le développement d'armes biologiques. La capacité de modifier rapidement un génome à un coût relativement faible par rapport aux méthodes précédentes pourrait faire des systèmes CRISPR des outils de sécurité.

Le CRISPR est un outil qui attire les acteurs malveillants à tous les niveaux, allant des individus jusqu'aux États-nations. Dans le domaine des menaces pour la biosécurité, CRISPR peut être utilisé à mauvais escient (265,266). Un organisme de novo serait entièrement synthétique, bien qu'il puisse avoir le même génome qu'un agent pathogène existant comme la variole. La création d'un organisme entièrement nouveau par synthèse est théoriquement possible, mais elle nécessitera probablement une formation, un financement et un temps considérables pour la recherche et le développement, ce qui est moins possible pour certains types d'acteurs(267).

Une étude menée en 2018 des Académies nationales des sciences, de l'ingénierie et de la médecine(268), a été entreprise pour élaborer des lignes directrices sur l'évaluation des risques de biosécurité associés aux nouvelles biotechnologies. Les auteurs ont classé les menaces potentielles par niveau de préoccupation et ont proposé des solutions ou des mesures de sécurité potentielles qui pourraient réduire le risque d'une certaine technologie. Les auteurs recommandent au ministère américain de la défense, qui a demandé cette étude, de continuer à innover et à s'engager dans la biotechnologie, mais qu'un cadre d'évaluation soit également utilisé pour examiner les nouvelles biotechnologies et leurs applications potentielles plus

larges dans les sphères scientifique et publique. Les auteurs ont également classé les risques potentiels par ordre d'importance relative, identifiant la recreation d'agents pathogènes connus, tels que la variole, comme l'un des plus grands risques, tandis que la création d'un nouvel agent pathogène est considérée comme un risque plus faible. CRISPR pourrait permettre de modifier rapidement et efficacement un agent pathogène pour qu'il possède les facteurs de virulence d'un autre agent pathogène, ou permettre à un chercheur de recréer un agent pathogène connu dont le génome est publié. Compte tenu de ces préoccupations en matière de biotechnologie, l'utilisation abusive de CRISPR mérite d'être reconnue comme une menace potentielle pour la biosécurité.

Bien qu'il ne s'agisse pas exactement d'un risque de biosécurité, l'accessibilité d'un puissant outil d'ingénierie génétique a déjà donné lieu à des défis éthiques, avec l'ingénierie des génomes embryonnaires humains par le scientifique chinois He Ji-ankui (269). Le travail de He a violé une norme de longue date interdisant la modification génétique de la germinale humaine, lorsque ces modifications peuvent être transmises aux générations futures. Un tribunal chinois a récemment déclaré He coupable de pratique médicale illégale et l'a condamné à trois ans de prison (270).

8.4. GENE DRIVE : impact écologique

Un effort international pour surveiller les efforts d'édition du génome humain est le Comité consultatif d'experts de l'OMS sur l'élaboration de normes mondiales pour la gouvernance et la surveillance de l'édition du génome humain(271). Ce comité a permis d'identifier de manière proactive les domaines de la recherche sur l'édition du génome humain qui pourraient nécessiter une gouvernance supplémentaire.

CRISPR est déjà couramment utilisé chez les animaux et les plantes à des fins de recherche, mais certains scénarios d'utilisation potentiels, tels que le *gene drive*, pourraient avoir des impacts environnementaux et agricoles à long terme. Les efforts actuels en matière d'entraînement génétique sont axés sur la lutte contre les parasites, l'enrichissement des cultures et la réduction des populations de vecteurs de maladies (272). Les efforts de *gene drive* chez des espèces telles que la souris à pieds blancs servent à réduire un hôte de tiques qui propage la maladie de Lyme. En ciblant ces souris pour les rendre résistantes à la bactérie

qui cause la maladie de Lyme, on peut briser le cycle de transmission pour réduire la transmission de la maladie de Lyme aux humains (273). Cependant, les écologistes s'inquiètent de la propagation et des impacts écologiques à long terme de ces souris, ce qui est très difficile à modéliser. Les recherches actuelles impliquant des agents pathogènes agricoles, tels que le virus de la striure du bananier qui s'intègre dans les génomes des bananes et rend la reproduction difficile, mettent en évidence les aspects à double usage de CRISPR (274). Les chercheurs ont pu utiliser CRISPR pour modifier les restes du génome du virus de la striure du bananier dans les bananes afin d'empêcher la réplication correcte du virus et d'améliorer les techniques de reproduction. Pourtant, un acteur malfaisant pourrait concevoir un système CRISPR qui améliore la virulence d'un virus afin qu'il soit capable de s'intégrer à une culture de manière similaire. Cela pourrait avoir un impact potentiel sur les sources alimentaires et serait difficile à contrôler. Il est important de noter que la livraison et d'autres problèmes d'armement rendraient cette tâche beaucoup plus difficile qu'il n'y paraît au départ, mais les risques de double usage doivent être reconnus lors de l'utilisation de CRISPR en agriculture.

Les lecteurs de gènes ont suscité l'inquiétude du public, qui craint que les changements soient difficiles à inverser et qu'ils aient des conséquences involontaires. Que ce soit par une mauvaise utilisation intentionnelle ou accidentelle, les lecteurs de gènes basés sur CRISPR pourraient avoir des impacts dramatiques sur les espèces indigènes en plus des cultures. En outre, CRISPR a été suggéré comme une méthode de contrôle des espèces envahissantes (275). Pourtant, les organismes génétiquement modifiés peuvent, en eux-mêmes, constituer une espèce envahissante s'ils sont introduits de manière inappropriée dans le milieu naturel.

Il est important d'identifier les lacunes dans les connaissances qui peuvent compliquer les efforts de contrôle des espèces modifiées par CRISPR, car il peut y avoir des effets inattendus tels que la modification du flux génétique au sein d'une population. Bien que de nombreuses études aient tenté de modéliser les pulsions génétiques au sein des populations, cela ne peut pas englober complètement un écosystème complexe et dynamique. Par exemple, des modèles ont indiqué que l'élimination des moustiques *A. gambiae* n'aurait pas de grands impacts sur l'écosystème (276). Cependant, il est très difficile de vérifier ce modèle, car on ne peut pas anéantir complètement une espèce de moustique pour " tester " l'impact de l'élimination de cette espèce.

Les tentatives d'utilisation des lecteurs de gènes pour décimer les cultures ou avoir un impact sur les ressources locales pourraient présenter une menace pour la biosécurité qui pourrait avoir un large éventail de conséquences. En gardant cela à l'esprit, la Defense Advanced Research Products Agency (DARPA) a créé le *Safe Genes Project* pour non seulement aborder les problèmes potentiels liés à la technologie du *gene drive* et à la biosécurité, mais aussi pour promouvoir la recherche défensive afin de créer des contre-mesures (277). Sept équipes de recherche sont financées par le projet, chacune d'entre elles ayant pour objectif global de (1) développer des outils génétiques permettant de mieux contrôler le *gene drive* ; (2) créer des traitements à base de médicaments pour inverser ou prévenir les effets du *gene drive* ; ou (3) identifier des moyens de médiation des impacts du *gene drive* sur les écosystèmes. Cet effort de coopération entre le gouvernement et les scientifiques est un excellent exemple de recherche avant-gardiste qui contribue à soutenir la recherche sur le génie génétique en la rendant plus sûre et plus responsable.

Conclusion

L'utilisation de CRISPR par des amateurs et des citoyens scientifiques présente également des complications en matière de biosécurité. Alors que de nombreuses questions de biosécurité, telles que la synthèse de novo d'un virus pathogène, peuvent nécessiter un scientifique expérimenté ayant accès à une variété de réactifs, les kits CRISPR largement disponibles ont été utilisés par des particuliers dans des tentatives (infructueuses) de modifier leurs propres génomes. Des acteurs intentionnels, bien qu'inexpérimentés, peuvent utiliser CRISPR pour modifier des micro-organismes existants afin d'augmenter leur pathogénicité, ou pour créer des organismes chimères. La démocratisation de ces kits peut constituer une avancée passionnante pour l'enseignement des sciences, et il est toujours possible que des entrepreneurs en biotechnologie fassent leurs débuts de cette manière, mais elle présente des défis pour les méthodes traditionnelles de formation à la biosécurité.

CONCLUSION

CONCLUSION

En l'espace de quelques décennies la science est passée de la découverte du matériel génétique à sa réécriture. CRISPR-Cas9 a démontré qu'aujourd'hui le champ des possibles peut être élargi. Prendre position sur la thérapie génique, c'est accepter le pour et le contre. Il est clair que la thérapie génique aura un impact sur l'avenir de la génétique. Avec une planification et une réglementation minutieuses, la thérapie génique deviendra la "médecine" de l'avenir proche. Le potentiel révolutionnaire de cette technologie est tel qu'il est impossible d'estimer jusqu'où elle peut aller et ce qu'elle signifie exactement pour l'avenir des soins de santé humains. Toutefois, même en tenant compte de ces éléments, on peut affirmer sans risque de se tromper que la thérapie génique va changer le monde.

Il faut tout de même se demander : Jusqu'où ira l'Homo sapiens si la question de « pouvoir » n'était plus une limite ?

RÉSUMÉS

RESUME

Thèse : Thérapie génique et CRISPR-cas9

Auteur : Fatima Zahra EL HACHIMI

Encadrant : Professeur Azzedine IBRAHIMI

Mots-clés : CRISPR-cas9 ; génome ; ADN ; thérapie génique

La découverte de la technologie CRISPR et des protéines associées (Cas) a élargi les applications de la recherche génétique dans des milliers de laboratoires à travers le monde et redéfinit notre approche de la thérapie génique. La thérapie génique traditionnelle a suscité quelques inquiétudes, car sa dépendance à l'égard de l'administration de transgènes thérapeutiques par des vecteurs viraux peut provoquer une oncogénèse par insertion et une toxicité immunogène. Si les vecteurs viraux restent un vecteur clé, la technologie CRISPR offre une alternative relativement simple et efficace pour l'édition de gènes spécifiques à un site, ce qui permet de dissiper certaines inquiétudes soulevées par la thérapie génique traditionnelle. Bien qu'elle présente des avantages apparents, la technologie CRISPR/Cas9 comporte son propre ensemble de limitations qui doivent être prises en compte pour une application clinique sûre et efficace. Ce travail se concentre sur l'évolution de la thérapie génique et le rôle de CRISPR dans le changement du paradigme de la thérapie génique, son accessibilité tant technique qu'économique, son énorme potentiel révolutionnaire dans le domaine des sciences biomédicales, qui doit toutefois être pris avec précaution.

ABSTRACT

Thesis : Gene therapy and CRISPR-cas9

Author : Fatima Zahra EL HACHIMI

Supervisor : Professor Azeddine IBRAHIMI

Key-words : CRISPR-cas9 ; genome ; DNA ; gene therapy

The discovery of CRISPR technology and associated proteins (Cas) has expanded the applications of genetic research in thousands of laboratories around the world and redefined our approach to gene therapy. There has been some concern about traditional gene therapy, as its dependence on the administration of therapeutic transgenes by viral vectors can lead to insertion oncogenesis and immunogenic toxicity. While viral vectors remain a key vector, CRISPR technology offers a relatively simple and effective alternative for editing site-specific genes, dispelling some of the concerns raised by traditional gene therapy. While there are apparent benefits, CRISPR/Cas9 has its own set of limitations that must be considered for a safe and effective clinical application. This work focuses on the evolution of gene therapy and the role of CRISPR in changing the paradigm of gene therapy, its technical and economic accessibility, its enormous revolutionary potential in the field of biomedical sciences, which must however be taken with caution.

العنوان: العلاج الجيني و تكنولوجيا كريسبر

المؤلف: فاطمة الزهراء الهاشمي

المشرف: البروفيسور عز الدين ابراهيمي

الكلمات الأساسية: كريسبر؛ الجينوم؛ الحمض النووي؛ العلاج الجيني

إن اكتشاف تكنولوجيا كريسبر والبروتينات المرتبطة بها (CAS) أدى إلى توسيع تطبيقات البحث الجيني في آلاف المختبرات حول العالم وإعادة تعريف نهجنا في العلاج الجيني. وقد كان هناك بعض القلق بشأن العلاج الجيني التقليدي، حيث أن اعتماده في عملية نقل الجينات العلاجية بواسطة المتجهات الفيروسية يمكن أن يؤدي إلى تكوين الأورام وسمية المناعة. وفي حين تظل المتجهات الفيروسية المتجهة الرئيسية، فإن تكنولوجيا كريسبر تقدم بديلا بسيطا وفعالا نسبيا لتحرير الجينات الخاصة بموقع محدد، الشيء الذي يساعد على تبديد بعض المخاوف التي يثيرها العلاج الجيني التقليدي. على الرغم من وجود فوائد واضحة، إلا أن تكنولوجيا كريسبر لديها مجموعة من القيود الخاصة بها والتي يجب أخذها في الاعتبار لتطبيق سريري آمن وفعال. يركز هذا العمل على تطور العلاج الجيني ودور تكنولوجيا كريسبر في تغيير نموذج العلاج الجيني، إمكانية الحصول عليه تقنيا واقتصاديا، وإمكانياته الثورية الهائلة في مجال علوم الطب الحيوي، التي يجب مع ذلك أن تؤخذ بحذر.

REFERENCES

REFERENCES

- [1] Définition de la thérapie génique [Internet]. Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique. Disponible sur: <https://www.sftcg.fr/patients-et-grand-public/dictionnaire-de-la-therapie-genique.aspx>
- [2] Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. Gene [Internet]. août 2013 [cité 24 sept 2021];525(2):162-9. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111913004344>
- [3] Alloway JL. THE TRANSFORMATION IN VITRO OF R PNEUMOCOCCI INTO S FORMS OF DIFFERENT SPECIFIC TYPES BY THE USE OF FILTERED PNEUMOCOCCUS EXTRACTS. J Exp Med [Internet]. 1 janv 1932 [cité 25 sept 2021];55(1):91-9. Disponible sur: <https://rupress.org/jem/article/55/1/91/10236/THE-TRANSFORMATION-IN-VITRO-OF-R-PNEUMOCOCCI-INTO>
- [4] Dawson MH. I. A TECHNIQUE FOR INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL. :19.
- [5] Alloway JL. FURTHER OBSERVATIONS ON THE USE OF PNEUMOCOCCUS EXTRACTS IN EFFECTING TRANSFORMATION OF TYPE IN VITRO. J Exp Med [Internet]. 1 févr 1933 [cité 26 sept 2021];57(2):265-78. Disponible sur: <https://rupress.org/jem/article/57/2/265/10356/FURTHER-OBSERVATIONS-ON-THE-USE-OF-PNEUMOCOCCUS>
- [6] Principe de transformation [Internet]. Disponible sur: <https://prezi.com/0sa3729xlb3/timeline-of-the-discovery-of-dna/?fallback=1>
- [7] Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. J Exp Med [Internet]. 1 févr 1944;79(2):137-58. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19871359>

- [8] Bases azotées d'ADN [Internet]. [cité 28 sept 2021]. Disponible sur: http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/introduction/structure_adn.html
- [9] Franklin R. Photo 51 [Internet]. King's College London. Disponible sur: <https://www.kcl.ac.uk/study/kings-in-time/a-photo-that-changed-the-world>
- [10] WATSON JD, CRICK FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [Internet]. 1 avr 1953;171(4356):737-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- [11] Structure de l'ADN [Internet]. Disponible sur: <https://www.exobiologie.fr/wp-content/uploads/2008/12/figure1-21.jpg>
- [12] WATSON JD, CRICK FHC. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* [Internet]. 1 mai 1953;171(4361):964-7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/171964b0>
- [13] Synthèse d'une protéine [Internet]. [cité 28 sept 2021]. Disponible sur: <https://biocelbiomoluff.wixsite.com/punf/img-dna-estrutura-e-replicao>
- [14] Hershey AD. Mutation of Bacteriophage with Respect to Type of Plaque. *Genetics* [Internet]. nov 1946;31(6):620-40. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17247224>
- [15] Réplication d'ADN [Internet]. [cité 28 sept 2021]. Disponible sur: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Mechanism-of-DNA-Synthesis-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Mechanism-of-DNA-Synthesis-(French).aspx)
- [16] Tatum EL, Lederberg J. Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol* [Internet]. juin 1947 [cité 26 sept 2021];53(6):673-84. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.53.6.673-684.1947>
- [17] Zinder ND, Lederberg J. GENETIC EXCHANGE IN SALMONELLA. *J Bacteriol* [Internet]. nov 1952 [cité 26 sept 2021];64(5):679-99. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.64.5.679-699.1952>

- [18] Szybalska EH, Szybalski W. Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 15 déc 1962;48(12):2026-34. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13980043>
- [19] Temin HM. Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus. Virology [Internet]. 1 févr 1961;13(2):158-63. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0042682261900496>
- [20] Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. août 1968;60(4):1288-95. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4299943>
- [21] ROGERS S, PFUDERER P. Use of Viruses as Carriers of Added Genetic Information. Nature [Internet]. 1 août 1968;219(5155):749-51. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/219749a0>
- [22] Rogers S, Lowenthal A, Terheggen HG, Columbo JP. Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. J Exp Med [Internet]. 1 avr 1973;137(4):1091-6. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4348278>
- [23] Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, Rogers S. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. Eur J Pediatr [Internet]. 1 mars 1975;119(1):1-3. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/BF00464689>
- [24] Mercola KE, Bar-Eli M, Stang HD, Slamon DJ, Cline MJ. INSERTION OF NEW GENETIC INFORMATION INTO BONE MARROW CELLS OF MICE: COMPARISON OF TWO SELECTABLE GENES*. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 1 déc 1982 [cité 27 sept 2021];397(1):272-80. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb43434.x>

- [25] Beutler E. the cline affair. *Mol Ther* [Internet]. 1 nov 2001 [cité 27 sept 2021];4(5):396-7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0486>
- [26] Mercola Karen E., Stang Howard D., Browne Jeffrey, Salser Winston, Cline Martin J. Insertion of a New Gene of Viral Origin into Bone Marrow Cells of Mice. *Science* [Internet]. 30 mai 1980 [cité 27 sept 2021];208(4447):1033-5. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.6246577>
- [27] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N Engl J Med* [Internet]. 30 août 1990 [cité 27 sept 2021];323(9):570-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>
- [28] Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 22 déc 1988 [cité 27 sept 2021];319(25):1676-80. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527>
- [29] Rosenberg SA. Gene Therapy for Cancer. *JAMA* [Internet]. 4 nov 1992 [cité 27 sept 2021];268(17):2416-9. Disponible sur: <https://doi.org/10.1001/jama.1992.03490170088031>
- [30] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N Engl J Med* [Internet]. 30 août 1990 [cité 27 sept 2021];323(9):570-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>

- [31] Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese M, Hwu P, Yannelli JR, Yang JC, et al. The development of gene therapy for the treatment of cancer. *Ann Surg* [Internet]. oct 1993;218(4):455-64. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8215637>
- [32] Blaese R. Michael, Culver Kenneth W., Miller A. Dusty, Carter Charles S., Fleisher Thomas, Clerici Mario, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA–SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* [Internet]. 20 oct 1995 [cité 27 sept 2021];270(5235):475-80. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
- [33] Bordignon Claudio, Notarangelo Luigi D., Nobili Nadia, Ferrari Giuliana, Casorati Giulia, Panina Paola, et al. Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA–Immunodeficient Patients. *Science* [Internet]. 20 oct 1995 [cité 27 sept 2021];270(5235):470-5. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.470>
- [34] Puumalainen A-M, Vapalahti M, Agrawal RS, Kossila M, Laukkanen J, Lehtolainen P, et al. β -Galactosidase Gene Transfer to Human Malignant Glioma In Vivo Using Replication-Deficient Retroviruses and Adenoviruses. *Hum Gene Ther* [Internet]. 10 août 1998 [cité 27 sept 2021];9(12):1769-74. Disponible sur: <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.12-1769>
- [35] Stolberg SG. The biotech death of Jesse Gelsinger. *N Y Times Mag* [Internet]. 20 oct 2001;136-40, 149-50. Disponible sur: https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/11647737/The_biotech_death_of_Jesse_Gelsinger_
- [36] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* [Internet]. 1 déc 1987 [cité 1 oct 2021];169(12):5429-33. Disponible sur: <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

- [37] Atsuo N, Hideo S, Mitsuko A. Cloning of alkaline phosphatase isozyme gene (iap) of *Escherichia coli*. *Gene* [Internet]. 1 oct 1982;19(3):313-9. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037811198290021X>
- [38] Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol*. 2018;200(7):17.
- [39] Stern MJ, Ames GF-L, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive Extragenic Palindromic Sequences: A Major Component of the Bacterial Genome. :12.
- [40] Nakata A, Amemura M, Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol* [Internet]. juin 1989;171(6):3553-6. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2656660>
- [41] Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* [Internet]. août 1991;59(8):2695-705. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1649798>
- [42] Groenen PMA, Bunschoten AE, Soolingen D van, Errtbden JDA van. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* [Internet]. 1 déc 1993 [cité 6 oct 2021];10(5):1057-65. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
- [43] Mojica FJM, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* [Internet]. 1 août 1993 [cité 6 oct 2021];9(3):613-21. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>

- [44] Mojica FJM, Rodríguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J* [Internet]. 1 sept 2016 [cité 6 oct 2021];283(17):3162-9. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/febs.13766>
- [45] Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol* [Internet]. 1 juill 1995 [cité 6 oct 2021];17(1):85-93. Disponible sur: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x
- [46] Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., et al. Life with 6000 Genes. *Science* [Internet]. 25 oct 1996 [cité 8 oct 2021];274(5287):546-67. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- [47] Jansen Ruud, Embden JanDA van, Gaastra Wim, Schouls LeoM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* [Internet]. 1 mars 2002 [cité 8 oct 2021];43(6):1565-75. Disponible sur: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- [48] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* [Internet]. 1 févr 2005;60(2):174-82. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- [49] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* [Internet]. 1 mars 2005 [cité 8 oct 2021];151(3):653-63. Disponible sur: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27437-0>

- [50] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* [Internet]. 16 mars 2006;1(1):7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- [51] Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin A-C, Richards M, Deveau H, Moineau S, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* [Internet]. 2007/12/07 éd. févr 2008;190(4):1401-12. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18065539>
- [52] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* [Internet]. 15 août 2008;321(5891):960-4. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18703739>
- [53] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011/08/03 éd. nov 2011;39(21):9275-82. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21813460>
- [54] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 25 sept 2012;109(39):E2579. Disponible sur: <http://www.pnas.org/content/109/39/E2579.abstract>
- [55] Jinek Martin, Chylinski Krzysztof, Fonfara Ines, Hauer Michael, Doudna Jennifer A., Charpentier Emmanuelle. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* [Internet]. 17 août 2012 [cité 8 oct 2021];337(6096):816-21. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- [56] Cong Le, Ran F. Ann, Cox David, Lin Shuailiang, Barretto Robert, Habib Naomi, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* [Internet]. 15 févr 2013 [cité 8 oct 2021];339(6121):819-23. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- [57] Mali Prashant, Yang Luhan, Esvelt Kevin M., Aach John, Guell Marc, DiCarlo James E., et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* [Internet]. 15 févr 2013 [cité 8 oct 2021];339(6121):823-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- [58] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* [Internet]. 1 févr 2012;482(7385):331-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature10886>
- [59] Koonin EV, Wolf YI. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008/10/23 éd. déc 2008;36(21):6688-719. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18948295>
- [60] Vincent M. de Grandpré, Felicia Lozon. Les dessous de la propriété intellectuelle relative au crispr-cas9 [Internet]. Osler. [cité 9 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.osler.com/fr/ressources/situations-critiques/2021/les-dessous-de-la-propriete-intellectuelle-relative-au-crispr-cas9>
- [61] Karvelis T, Gasiunas G, Siksnys V. Programmable DNA cleavage in vitro by Cas9. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 20 nov 2013 [cité 10 sept 2021];41(6):1401-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1042/BST20130164>
- [62] Erik J.Sontheimer et al. RNA-directed DNA cleavage and gene editing by Cas9 enzyme from *Neisseria meningitidis* [Internet]. US 2014034.9405A1 [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a7/c0/ef/ca8a617238844d/US20140349405A1.pdf>

- [63] Inventor Jennifer A. DOUDNAMartin JinekKrzysztof ChylinskiEmmanuelle Charpentier. Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription [Internet]. Universitaet Wien University of California; US10113167B2 [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US10113167B2/en>
- [64] Feng Zhang. CRISPR-CAS SYSTEMS AND METHODS FOR ALTERING EXPRESSION OF GENE PRODUCTS [Internet]. Broad Institute, Harvard University; US8697359 B1 [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.broadinstitute.org/patents/crispr-cas-systems-and-methods-altering-expression-gene-products-2>
- [65] Jacob S. Sherkow. Showdown Is On: How Did We Get Here and What Comes Next? [Internet]. Stanford Law School. [cité 22 oct 2021]. Disponible sur: <https://law.stanford.edu/2015/12/29/the-crispr-patent-interference-showdown-is-on-how-did-we-get-here-and-what-comes-next/>
- [66] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* [Internet]. 5 juin 2014;157(6):1262-78. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24906146>
- [67] Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han Y-C, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* [Internet]. 1 déc 2014;516(7531):423-7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature13902>
- [68] Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1 sept 2014;32(9):947-51. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>

- [69] Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014/03/30 éd. juin 2014;32(6):551-3. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681508>
- [70] Zoé JACQUINOT. Crispr : fin de la bataille rangée sur les brevets ? [Internet]. *Inf°OGM*. 2020 [cité 20 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.infogm.org/6980-crispr-fin-de-la-bataille-rangee-sur-les-brevets>
- [71] Les deux voies de la thérapie génique [Internet]. Disponible sur: <https://www.pinterest.fr/pin/453034043740977495/>
- [72] Les différentes applications de la thérapie génique [Internet]. Disponible sur: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gene-therapy>
- [73] Achenbach TV, Brunner B, Heermeier K. Oligonucleotide-Based Knockdown Technologies: Antisense Versus RNA Interference. *ChemBioChem* [Internet]. 6 oct 2003 [cité 26 oct 2021];4(10):928-35. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/cbic.200300708>
- [74] Mécanisme d'action d'un ARNm antisens [Internet]. [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-strategies-transgenese/>
- [75] Baker BF, Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr* [Internet]. 10 déc 1999;1489(1):3-18. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478199001463>
- [76] Gonzalez-Alegre P. RNA Interference. In: Kompoliti K, Metman LV, éditeurs. *Encyclopedia of Movement Disorders* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2010. p. 47-9. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741059001921>

- [77] Principe d'inactivation des gènes par ARN interférent [Internet]. [cité 30 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-strategies-transgenese/>
- [78] miRNA et siRNA [Internet]. Disponible sur: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-are-the-differences-between-miRNA-and-siRNA>
- [79] Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2013/09/17 éd. nov 2013;5(11):1642-61. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24106209>
- [80] Pavirani A, Schatz C, Mehtali M. Thérapie génique de la mucoviscidose par transfert adénoviral du gène CFTR. *médecine/sciences* [Internet]. 1996 [cité 30 oct 2021];12(1):2525-33. Disponible sur: <http://hdl.handle.net/10608/600>
- [81] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy. *Genes Cure Cancer* [Internet]. 1 févr 2007;28(1):4-41. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299707000027>
- [82] Karjoo Z, Chen X, Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2015/05/22 éd. 1 avr 2016;99(Pt A):113-28. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26004498>
- [83] Parato KA, Senger D, Forsyth PAJ, Bell JC. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* [Internet]. déc 2005 [cité 31 oct 2021];5(12):965-76. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/nrc1750>
- [84] Ning J, Rabkin SD. Chapter 19 - Current Status of Gene Therapy for Brain Tumors*. In: Laurence J, Franklin M, éditeurs. *Translating Gene Therapy to the Clinic* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015. p. 305-23. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005637000191>

- [85] Watanabe Y, Kojima T, Kagawa S, Uno F, Hashimoto Y, Kyo S, et al. A novel translational approach for human malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy. *Oncogene* [Internet]. 1 févr 2010;29(8):1145-54. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.415>
- [86] Mary Topalovski. *Oncolytic Viruses in Cancer Therapy* [Internet]. [cité 31 oct 2021]. Disponible sur: <https://blog.crownbio.com/oncolytic-viruses-immunotherapy>
- [87] Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther - Oncolytics* [Internet]. 1 janv 2016;3:16015. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770516300390>
- [88] Natural killer cells for cancer immunotherapy: a new CAR is catching up. *EBioMedicine* [Internet]. 1 janv 2019 [cité 31 oct 2021];39:1-2. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.018>
- [89] Stoddard BL. Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys* [Internet]. 2006/02/09 éd. 2005;38(1):49-95. Disponible sur: <https://www.cambridge.org/core/article/homing-endonuclease-structure-and-function/CDACC8E437866D03359353E8E9BA7578>
- [90] Kim YG, Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1 févr 1994;91(3):883-7. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7905633>
- [91] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 6 févr 1996;93(3):1156-60. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8577732>

- [92] Kim Y-G, Smith J, Durgesha M, Chandrasegaran S. Chimeric Restriction Enzyme: Gal4 Fusion to FokI Cleavage Domain. 1998;379(4-5):489-96. Disponible sur: <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.4-5.489>
- [93] Pavletich Nikola P., Pabo Carl O. Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. Science [Internet]. 10 mai 1991 [cité 24 oct 2021];252(5007):809-17. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.2028256>
- [94] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1 sept 1998;95(18):10570-5. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9724744>
- [95] Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, et al. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 6 juin 2000;97(12):6658. Disponible sur: <http://www.pnas.org/content/97/12/6658.abstract>
- [96] Boch Jens, Scholze Heidi, Schornack Sebastian, Landgraf Angelika, Hahn Simone, Kay Sabine, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. Science [Internet]. 11 déc 2009 [cité 25 oct 2021];326(5959):1509-12. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- [97] Dupret B, Angrand P. L'ingénierie des génomes par les TALEN. M -Med Sci. 2014;30:186-93.
- [98] Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. août 2019;20(8):490-507. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31147612>
- [99] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science [Internet]. 19 déc 2008;322(5909):1843-5. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19095942>

- [100] Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014/04/11 éd. juin 2014;42(10):6091-105. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24728998>
- [101] Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* [Internet]. 1 nov 2010;468(7320):67-71. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature09523>
- [102] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* [Internet]. 1 nov 2013;8(11):2281-308. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- [103] Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, Gunderson CW, Seifert HS, Schoen C, et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Cell* [Internet]. 23 mai 2013;50(4):488-503. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23706818>
- [104] Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* [Internet]. 2013/05/02 éd. 9 mai 2013;153(4):910-8. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23643243>
- [105] Retouche génomique par le système CRISPR-cas9 [Internet]. [cité 4 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-edition-genome-retouche-genetique-crispr-cas9/>
- [106] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2010;79:181-211. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192759>

- [107] Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* [Internet]. 2013/08/29 éd. 12 sept 2013;154(6):1380-9. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23992846>
- [108] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* [Internet]. 2013/01/03 éd. 15 févr 2013;339(6121):819-23. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23287718>
- [109] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014/03/02 éd. avr 2014;32(4):347-55. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24584096>
- [110] Yang H, Ren S, Yu S, Pan H, Li T, Ge S, et al. Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *Int J Mol Sci* [Internet]. 4 sept 2020;21(18):6461. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32899704>
- [111] Wang H-X, Li M, Lee CM, Chakraborty S, Kim H-W, Bao G, et al. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. *Chem Rev* [Internet]. 9 août 2017;117(15):9874-906. Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00799>
- [112] Reed SD, Li S. Electroporation advances in large animals. *Curr Gene Ther* [Internet]. août 2009;9(4):316-26. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19545229>
- [113] Meijering BDM, Juffermans LJM, van Wamel A, Henning RH, Zuhorn IS, Emmer M, et al. Ultrasound and Microbubble-Targeted Delivery of Macromolecules Is Regulated by Induction of Endocytosis and Pore Formation. *Circ Res* [Internet]. 13 mars 2009 [cité 3 déc 2021];104(5):679-87. Disponible sur: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183806>

- [114] Chen S, Grayburn PA. Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction for Cardiac Gene Delivery. In: Ishikawa K, éditeur. Cardiac Gene Therapy [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cité 3 déc 2021]. p. 205-18. (Methods in Molecular Biology; vol. 1521). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6588-5_14
- [115] Huang C, Zhang H, Bai R. Advances in ultrasound-targeted microbubble-mediated gene therapy for liver fibrosis. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2017/03/15 éd. juill 2017;7(4):447-52. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28752029>
- [116] Song S, Noble M, Sun S, Chen L, Brayman AA, Miao CH. Efficient microbubble- and ultrasound-mediated plasmid DNA delivery into a specific rat liver lobe via a targeted injection and acoustic exposure using a novel ultrasound system. *Mol Pharm* [Internet]. 2012/07/25 éd. 6 août 2012;9(8):2187-96. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22779401>
- [117] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* [Internet]. 16 avr 2012 [cité 12 mars 2021];443(3):603-18. Disponible sur: <https://doi.org/10.1042/BJ20120146>
- [118] Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* [Internet]. août 2005;5(4):387-98. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101513>
- [119] Weber T, Zangi L, Hajjar RJ. Gene Therapy for Cardiovascular Diseases. In: *Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease* [Internet]. Elsevier; 2016 [cité 3 déc 2021]. p. 377-87. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128018880000291>
- [120] Shearer RF, Saunders DN. Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives. *Genes Cells* [Internet]. 1 janv 2015 [cité 3 déc 2021];20(1):1-10. Disponible sur: <https://doi.org/10.1111/gtc.12183>

- [121] Cavazzana-Calvo Marina, Hacein-Bey Salima, Basile Geneviève de Saint, Gross Fabian, Yvon Eric, Nusbaum Patrick, et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* [Internet]. 28 avr 2000 [cité 3 déc 2021];288(5466):669-72. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.669>
- [122] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* [Internet]. sept 2008;118(9):3132-42. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18688285>
- [123] Schlimgen R, Howard J, Wooley D, Thompson M, Baden LR, Yang OO, et al. Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies. *J Occup Environ Med* [Internet]. déc 2016;58(12):1159-66. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27930472>
- [124] Wanisch K, Yáñez-Muñoz RJ. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* [Internet]. 2009/06/02 éd. août 2009;17(8):1316-32. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19491821>
- [125] Cai Y, Bak RO, Mikkelsen JG. Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases. *eLife* [Internet]. 24 avr 2014;3:e01911-e01911. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24843011>
- [126] Choi JG, Dang Y, Abraham S, Ma H, Zhang J, Guo H, et al. Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther* [Internet]. 1 juill 2016;23(7):627-33. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/gt.2016.27>
- [127] Douglas JT. Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* [Internet]. 1 mai 2007;36(1):71-80. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0021-5>
- [128] Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res* [Internet]. 2009/02/26 éd. août 2009;143(2):184-94. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19647886>

- [129] Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* [Internet]. 1 oct 1999;401(6753):517-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/43977>
- [130] McKelvey T, Tang A, Bett AJ, Casimiro DR, Chastain M. T-cell response to adenovirus hexon and DNA-binding protein in mice. *Gene Ther* [Internet]. 1 mai 2004;11(9):791-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302232>
- [131] Gregory SM, Nazir SA, Metcalf JP. Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol* [Internet]. mars 2011;6(3):357-74. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21738557>
- [132] Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* [Internet]. 1 oct 2005;12(1):S18-27. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302612>
- [133] Puntel M, A K M GM, Farrokhi C, Vanderveen N, Paran C, Appelhans A, et al. Safety profile, efficacy, and biodistribution of a bicistronic high-capacity adenovirus vector encoding a combined immunostimulation and cytotoxic gene therapy as a prelude to a phase I clinical trial for glioblastoma. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2013/02/09 éd. 1 mai 2013;268(3):318-30. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23403069>
- [134] Ehrke-Schulz E, Schiwon M, Leitner T, Dávid S, Bergmann T, Liu J, et al. CRISPR/Cas9 delivery with one single adenoviral vector devoid of all viral genes. *Sci Rep* [Internet]. 7 déc 2017;7(1):17113-17113. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29215041>
- [135] Maggio I, Gonçalves MAFV. Genome editing at the crossroads of delivery, specificity, and fidelity. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1 mai 2015;33(5):280-91. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779915000499>

- [136] Atchison Robert W., Casto Bruce C., Hammon William McD. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* [Internet]. 13 août 1965 [cité 3 déc 2021];149(3685):754-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.149.3685.754>
- [137] Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. oct 2008;21(4):583-93. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18854481>
- [138] Ronzitti G, Gross D-A, Mingozzi F. Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol* [Internet]. 17 avr 2020;11:670-670. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32362898>
- [139] Surosky RT, Urabe M, Godwin SG, McQuiston SA, Kurtzman GJ, Ozawa K, et al. Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* [Internet]. oct 1997;71(10):7951-9. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9311886>
- [140] Yoon DS, Lee K-M, Cho S, Ko EA, Kim J, Jung S, et al. Cellular and Tissue Selectivity of AAV Serotypes for Gene Delivery to Chondrocytes and Cartilage. *Int J Med Sci* [Internet]. 2021;18:3353-60. Disponible sur: <https://www.medsci.org/v18p3353.htm>
- [141] Lau C-H, Suh Y. In vivo genome editing in animals using AAV-CRISPR system: applications to translational research of human disease. *F1000Research* [Internet]. 20 déc 2017;6:2153-2153. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29333255>
- [142] Ain QU, Chung JY, Kim Y-H. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *3rd Symp Innov Polym Control Deliv SIPCD 2014* [Internet]. 10 mai 2015;205:120-7. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914008335>

- [143] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2013/05/09 éd. juill 2013;31(7):397-405. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23664777>
- [144] Senís E, Fatouros C, Große S, Wiedtke E, Niopek D, Mueller A-K, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol J* [Internet]. 1 nov 2014 [cité 3 déc 2021];9(11):1402-12. Disponible sur: <https://doi.org/10.1002/biot.201400046>
- [145] Friedland AE, Baral R, Singhal P, Loveluck K, Shen S, Sanchez M, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol* [Internet]. 24 nov 2015;16:257-257. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26596280>
- [146] Simões S, Filipe A, Faneca H, Mano M, Penacho N, Duzgunes N, et al. Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. avr 2005;2:237-54.
- [147] Majzoub RN, Ewert KK, Safinya CR. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* [Internet]. 28 juill 2016;374(2072):20150129. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27298431>
- [148] Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1 janv 2015;33(1):73-80. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>
- [149] Glass Z, Li Y, Xu Q. Nanoparticles for CRISPR–Cas9 delivery. *Nat Biomed Eng* [Internet]. 1 nov 2017;1(11):854-5. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0158-x>

- [150] Lee K, Conboy M, Park HM, Jiang F, Kim HJ, Dewitt MA, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng* [Internet]. 2017/10/02 éd. 2017;1:889-901. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29805845>
- [151] Wang M, Glass ZA, Xu Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther* [Internet]. 1 mars 2017;24(3):144-50. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/gt.2016.72>
- [152] Gagat M, Zielińska W, Grzanka A. Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2017/10/04 éd. déc 2017;40(6):1615-23. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29039455>
- [153] Rádis-Baptista G, Campelo IS, Morlighem J-ÉRL, Melo LM, Freitas VJF. Cell-penetrating peptides (CPPs): From delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis. *J Biotechnol* [Internet]. 20 juin 2017;252:15-26. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617302031>
- [154] Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. Cell-Penetrating Peptide-Mediated Delivery of Cas9 Protein and Guide RNA for Genome Editing. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2017. p. 81-94.
- [155] Ramakrishna S, Kwaku Dad A-B, Beloor J, Gopalappa R, Lee S-K, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res* [Internet]. 2014/04/02 éd. juin 2014;24(6):1020-7. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24696462>

- [156] Del'Guidice T, Lepetit-Stoffaes J-P, Bordeleau L-J, Roberge J, Théberge V, Lauvaux C, et al. Membrane permeabilizing amphiphilic peptide delivers recombinant transcription factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 ribonucleoproteins in hard-to-modify cells. *PloS One* [Internet]. 4 avr 2018;13(4):e0195558-e0195558. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29617431>
- [157] Mircetic J, Steinebrunner I, Ding L, Fei J-F, Bogdanova A, Drechsel D, et al. Purified Cas9 Fusion Proteins for Advanced Genome Manipulation. *Small Methods*. mars 2017;1:1600052.
- [158] Composants plasmidiques [Internet]. Add Gene. [cité 21 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/#origins>
- [159] Architecture plasmidique [Internet]. [cité 21 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/#origins>
- [160] Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol Ther* [Internet]. 1 juin 2008 [cité 9 déc 2021];16(6):1073-80. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.76>
- [161] Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature* [Internet]. 1 avr 2016;532(7599):293-293. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754>
- [162] Ledford H. Gene-editing surges as US rethinks regulations. *Nature* [Internet]. 1 avr 2016;532(7598):158-9. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/532158a>
- [163] CRISPR Therapeutics and Bayer Announce an Update on Casebia Therapeutics [Internet]. CRISPR therapeutics. [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/crispr-therapeutics-and-bayer-announce-an-update-on-casebia-therapeutics>

- [164] Cui H, Wang A. The Biological Impact of the Hypervariable N-Terminal Region of Potyviral Genomes. *Annu Rev Virol* [Internet]. 29 sept 2019 [cité 20 nov 2021];6(1):255-74. Disponible sur: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015843>
- [165] Yoon Y-J, Venkatesh J, Lee J-H, Kim J, Lee H-E, Kim D-S, et al. Genome Editing of eIF4E1 in Tomato Confers Resistance to Pepper Mottle Virus. *Front Plant Sci* [Internet]. 24 juill 2020 [cité 22 nov 2021];11:1098. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.01098/full>
- [166] Li C, Guan X, Du T, Jin W, Wu B, Liu Y, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9 [Internet]. Vol. 96, *Journal of General Virology*. Microbiology Society; 2015. p. 2381-93. Disponible sur: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.000139>
- [167] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* [Internet]. 26 août 2013;3(1):2510. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/srep02510>
- [168] Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep* [Internet]. 20 oct 2015;5(1):15577. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/srep15577>
- [169] Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015/07/27 éd. 18 août 2015;112(33):10437-42. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216948>
- [170] Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014/06/09 éd. 1 juill 2014;111(26):9591-6. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24927590>

- [171] Andrew Pollack. The New York Times. 28 nov 2011 [cité 28 nov 2021]; Disponible sur: <https://www.nytimes.com/2011/11/29/health/new-hope-of-a-cure-for-hiv.html>
- [172] Wang W, Ye C, Liu J, Zhang D, Kimata JT, Zhou P. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. PloS One [Internet]. 26 déc 2014;9(12):e115987-e115987. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25541967>
- [173] Huang Z, Tomitaka A, Raymond A, Nair M. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. Gene Ther [Internet]. 1 juill 2017;24(7):377-84. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/gt.2017.35>
- [174] Répartition des indications en thérapie génique [Internet]. [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.americangene.com/blog/5-reasons-gene-therapy-companies-are-vital-to-the-future-of-biopharma/>
- [175] Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. Nature [Internet]. 1 nov 2016;539(7630):479-479. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.20988>
- [176] Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. Cell Rep [Internet]. 2015/08/20 éd. 1 sept 2015;12(9):1385-90. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26299960>
- [177] KEYTRUDA [Internet]. [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.keytruda.com>
- [178] OPVIDO [Internet]. HAUTE AUTORITE DE SANTE. [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2612055/fr/opdivo-nivolumab-anticorps-anti-pd1

- [179] Trinh VA, Joseph J, Hwu W-J. Anti-programmed cell death-1 (PD-1) monoclonal antibodies in treating advanced melanoma – a clinical update. *Discov Med* [Internet]. janv 2018;25(135):31—40. Disponible sur: <http://europepmc.org/abstract/MED/29466692>
- [180] Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep* [Internet]. 28 janv 2016;6(1):20070. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/srep20070>
- [181] Liu Q. World-First Phase I Clinical Trial for CRISPR-Cas9 PD-1-Edited T-Cells in Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer. *Glob Med Genet* [Internet]. 2020/12/07 éd. oct 2020;7(3):73-4. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33392608>
- [182] Ruan G-X, Barry E, Yu D, Lukason M, Cheng SH, Scaria A. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* [Internet]. 2017/01/18 éd. 1 févr 2017;25(2):331 -41. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28109959>
- [183] Editas Medicine, Inc. Single Ascending Dose Study in Participants With LCA10 [Internet]. clinicaltrials.gov. [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03872479>
- [184] Ned Pagliarulo. After long wait, Editas reveals first data for CRISPR gene editing treatment [Internet]. *BIOPHARMA DIVE*. 2021 [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.biopharmadive.com/news/editas-crispr-gene-editing-first-results-blindness/607287/>
- [185] ProQR. Illuminate - Phase 2/3 clinical trial for CEP290 mediated Leber congenital amaurosis [Internet]. [ProQR.com](https://www.proqr.com). [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.proqr.com/illuminate-study-for-leber-congenital-amaurosis>

- [186] Deev RV, Bozo IY, Mzhavanadze ND, Voronov DA, Gavrilenko AV, Chervyakov YV, et al. pCMV-vegfl65 Intramuscular Gene Transfer is an Effective Method of Treatment for Patients With Chronic Lower Limb Ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* [Internet]. 1 sept 2015 [cité 9 déc 2021];20(5):473-82. Disponible sur: <https://doi.org/10.1177/1074248415574336>
- [187] DRUG DISCOVERY & DEVELOPMENT. [cité 9 déc 2021]; Disponible sur: <https://web.archive.org/web/20150903230011/http://www.dddmag.com/news/2011/12/gene-therapy-pad-approved>
- [188] EMA. Imlygic RCP du produit [Internet]. [cité 9 déc 2021]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imlygic-epar-product-information_fr.pdf
- [189] Zhang W-W, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Hum Gene Ther* [Internet]. 1 févr 2018 [cité 9 déc 2021];29(2):160-79. Disponible sur: <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
- [190] LUXTURNA (voretigène néparvovec) [Internet]. HAUTE AUTORITE DE SANTE. 2019 [cité 9 déc 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2964759/fr/luxturna-voretigene-neparvovec
- [191] Liang M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Curr Cancer Drug Targets*. nov 2017;18.
- [192] Glybera [Internet]. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. [cité 9 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>
- [193] Mahajan R. Onasemnogene Abeparvovec for Spinal Muscular Atrophy: The Costlier Drug Ever. *Int J Appl Basic Med Res* [Internet]. 2019;9(3):127-8. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31392173>

- [194] Vignal-Clermont C, Girmens J-F, Audo I, Said SM, Errera M-H, Plaine L, et al. Safety of Intravitreal Gene Therapy for Treatment of Subjects with Leber Hereditary Optic Neuropathy due to Mutations in the Mitochondrial ND4 Gene: The REVEAL Study. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* [Internet]. 2021/02/10 éd. mars 2021;35(2):201-14. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33566264>
- [195] Zeukeng M-J, Seoane-Vazquez E, Bonnabry P. A comparison of new drugs approved by the FDA, the EMA, and Swissmedic: an assessment of the international harmonization of drugs. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 1 juin 2018;74(6):811-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00228-018-2431-7>
- [196] Shukla V, Seoane-Vazquez E, Fawaz S, Brown L, Rodriguez-Monguio R. The Landscape of Cellular and Gene Therapy Products: Authorization, Discontinuations, and Cost. *Hum Gene Ther Clin Dev* [Internet]. 1 sept 2019 [cité 10 déc 2021];30(3):102-13. Disponible sur: <https://doi.org/10.1089/humc.2018.201>
- [197] Deloitte. Next Generation Therapies and related Life Sciences topics [Internet]. 2020 [cité 10 déc 2021]. Disponible sur: <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/global/Documents/Finance/gx-finance-next-generation-therapies.pdf>
- [198] Global cancer gene therapy market 2021-2025 [Internet]. Disponible sur: <https://www.businesswire.com/news/home/20210121005646/en/Global-Cancer-Gene-Therapy-Market-Research-during-2021-2025-Industry-Planning-Analysis-for-the-New-Normal-Technavio>
- [199] Driscoll D, Farnia S, Kefalas P, Maziarz RT. Concise Review: The High Cost of High Tech Medicine: Planning Ahead for Market Access. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. août 2017;6(8):1723-9. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28749065>

- [200] Kent A, Spink J. Will rising prices and budget constraints prevent patients from accessing novel gene therapies? *Gene Ther* [Internet]. 1 sept 2017;24(9):542-3. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/gt.2017.66>
- [201] David Cutler P, Michael Ciarametaro M, Genia Long M, Noam Kirson P, Robert Dubois M PhD. Insurance Switching and Mismatch Between the Costs and Benefits of New Technologies. *Am J Manag Care* [Internet]. 13 déc 2017 [cité 10 déc 2021];23(12). Disponible sur: <https://www.ajmc.com/view/insurance-switching-and-mismatch-between-the-costs-and-benefits-of-new-technologies>
- [202] Azvolinsky A. Gene therapy « cure » for blindness wanes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1 juill 2015;33(7):678-678. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nbt0715-678>
- [203] Büning H. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO Mol Med* [Internet]. janv 2013;5(1):1-3. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23283747>
- [204] Touchot N, Flume M. Early Insights from Commercialization of Gene Therapies in Europe. *Genes* [Internet]. 17 févr 2017;8(2):78. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28218692>
- [205] Turner L. US stem cell clinics, patient safety, and the FDA. *Trends Mol Med* [Internet]. 1 mai 2015 [cité 10 déc 2021];21(5):271-3. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.02.008>
- [206] Stern JH, Tian Y, Funderburgh J, Pellegrini G, Zhang K, Goldberg JL, et al. Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision. *Cell Stem Cell* [Internet]. 1 juin 2018;22(6):834-49. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29859174>

- [207] Emily Mullin. 2017 Was the Year of Gene-Therapy Breakthroughs. MIT Technology Review. 3 janv 2018 [cité 11 déc 2021]; Disponible sur: <https://www.technologyreview.com/2018/01/03/67524/2017-was-the-year-of-gene-therapy-breakthroughs/>
- [208] Hanna E, Dorey J, Aballéa S, Auquier P, Toumi M. Will Stem Cells For Heart Failure Be The Next Sofosbuvir Issue? Value Health. nov 2016;19:A656.
- [209] Jia J, Wei C, Chen S, Li F, Tang Y, Qin W, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide. *Alzheimers Dement* [Internet]. avr 2018 [cité 11 déc 2021];14(4):483-91. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.jalz.2017.12.006>
- [210] Abou-el-Enein M, Bauer G, Reinke P. The business case for cell and gene therapies. *Nat Biotechnol*. déc 2014;32:1192-3.
- [211] Senior M. Rollout of high-priced cell and gene therapies forces payer rethink. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1 avr 2018;36(4):291-2. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nbt0418-291a>
- [212] Seoane-Vazquez E, Shukla V, Rodriguez-Monguio R. Innovation and competition in advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med* [Internet]. mars 2019;11(3):e9992. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30770338>
- [213] Rittié L, Athanasopoulos T, Calero-Garcia M, Davies ML, Dow DJ, Howe SJ, et al. The Landscape of Early Clinical Gene Therapies outside of Oncology. *Mol Ther* [Internet]. 2 oct 2019 [cité 12 déc 2021];27(10):1706-17. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.002>
- [214] Butler D. Translational research: Crossing the valley of death. *Nature* [Internet]. 1 juin 2008;453(7197):840-2. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/453840a>

- [215] DIGIUSTO DL, MELSOP K, SRIVASTAVA R, TRAN C-AT. Proceedings of the first academic symposium on developing, qualifying and operating a cell and gene therapy manufacturing facility. *Cytherapy* [Internet]. 1 déc 2018 [cité 12 déc 2021];20(12):1486-94. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.07.008>
- [216] Mullard A. NIH tackles clinical trial shortcomings. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 1 mai 2016;15(5):297-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.87>
- [217] Mervis Jeffrey. When the payoff for academics drops, commercialization suffers. *Science* [Internet]. 22 avr 2016 [cité 12 déc 2021];352(6284):396-396. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.352.6284.396>
- [218] Ellis S. BRACED FOR THE BIOTECH BOOM. :4.
- [219] Gilead sciences to acquire Kite Pharma for \$11.9 Billion [Internet]. GILEAD. 2017 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2017/8/gilead-sciences-to-acquire-kite-pharma-for-119-billion>
- [220] Jean-Michel Bezat. « Big Pharma » fait son marché. *Le Monde*. 23 janv 2018 [cité 12 déc 2021]; Disponible sur: https://www.lemonde.fr/economie/article/2018/01/23/big-pharma-fait-son-marche_5245819_3234.html
- [221] NOVARTIS. Novartis enters agreement to acquire AveXis Inc. for USD 8.7 bn to transform care in SMA and expand position as a gene therapy and Neuroscience leader [Internet]. NOVARTIS. 2018 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-enters-agreement-acquire-avexis-inc-usd-87-bn-transform-care-sma-and-expand-position-gene-therapy-and-neuroscience-leader>

- [222] Astellas to acquire Audentes at a price of US\$60.00 per share in cash, representing a total equity value of approximately US\$3 billion. [Internet]. 2019 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: https://www.astellasgenetherapies.com/press_release/astellas-enters-definitive-agreement-acquire-audentes/
- [223] Spark Therapeutics Enters into a Licensing and Supply Agreement for Investigational Voretigene Neparvec Outside the U.S. [Internet]. sparktx.com. 2018 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: https://sparktx.com/press_releases/spark-therapeutics-enters-into-a-licensing-and-supply-agreement-for-investigational-voretigene-neparvec-outside-the-u-s/
- [224] PFIZER AND CELLECTIS ENTER INTO GLOBAL STRATEGIC CANCER IMMUNOTHERAPY COLLABORATION [Internet]. Pfizer.com. 2014 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer_and_cellectis_enter_into_global_strategic_cancer_immunotherapy_collaboration
- [225] Bartlett JS, Samulski RJ. Fluorescent viral vectors: A new technique for the pharmacological analysis of gene therapy. *Nat Med* [Internet]. 1 mai 1998;4(5):635-7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nm0598-635>
- [226] Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman G, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther*. août 1998;5:938-45.
- [227] Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* [Internet]. 2015/10/06 éd. févr 2016;24(2):287-97. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26437810>
- [228] nature. Three is the magic number in gene therapy production [Internet]. nature.com. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/d42473-018-00017-z>

- [229] Anderson WF. Human gene therapy. *Science*. 1998;256(5058):25-9.
- [230] National Academy of Sciences, National Academy of Medicine, National Academies of Sciences E and Medicine. Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance [Internet]. Washington, DC: The National Academies Press; 2017. Disponible sur: <https://www.nap.edu/catalog/24623/human-genome-editing-science-ethics-and-governance>
- [231] Marcy Darnovsky. A Note on the Upcoming Human Genome Editing Summit [Internet]. Center for genetics and society. 2021 [cité 13 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.geneticsandsociety.org/biopolitical-times/summits-and-discussions-about-heritable-human-genome-editing>
- [232] Baltimore David, Berg Paul, Botchan Michael, Carroll Dana, Charo R. Alta, Church George, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* [Internet]. 3 avr 2015 [cité 13 déc 2021];348(6230):36-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.aab1028>
- [233] Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 1 mai 2016;33(5):581-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0710-8>
- [234] Callaway E. Doubts raised about CRISPR gene-editing study in human embryos. *Nature* [Internet]. 31 août 2017; Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature.2017.22547>
- [235] Egli D, Zuccaro MV, Kosicki M, Church GM, Bradley A, Jasin M. Inter-homologue repair in fertilized human eggs? *Nature* [Internet]. 1 août 2018;560(7717):E5-7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0379-5>
- [236] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, Hayama T, Darby H, et al. Ma et al. reply. *Nature* [Internet]. 1 août 2018;560(7717):E10-23. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0381-y>

- [237] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* [Internet]. 1 août 2017;548(7668):413-9. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nature23305>
- [238] Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* [Internet]. 1 mai 2015;6(5):363-72. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
- [239] Stern HJ. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J Clin Med* [Internet]. 2014;3(1):280-309. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2077-0383/3/1/280>
- [240] Mulvihill JJ, Capps B, Joly Y, Lysaght T, Zwart HAE, Chadwick R, et al. Ethical issues of CRISPR technology and gene editing through the lens of solidarity. *Br Med Bull* [Internet]. 1 juin 2017 [cité 13 déc 2021];122(1):17-29. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx002>
- [241] Sykora P. Chapter 11 Germline Gene Therapy in the Era of Precise Genome Editing: How Far Should We Go? In: *Philosophy and Medicine*. 2018. p. 157-71.
- [242] Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights Adopted by the General Conference of the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization at its twenty-ninth session on 11 November 1997; endorsed by General Assembly resolution 53/152 of 9 December 1998 [Internet]. [cité 14 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.ohchr.org/en/professionalinterest/pages/humangenomeandhumanrights.aspx>
- [243] Li J-R, Walker S, Nie J-B, Zhang X-Q. Experiments that led to the first gene-edited babies: the ethical failings and the urgent need for better governance. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2019;20(1):32-8. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30614228>

- [244] Herbert M, Turnbull D. Progress in mitochondrial replacement therapies. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 1 févr 2018;19(2):71-2. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrm.2018.3>
- [245] Sharma H, Singh D, Mahant A, Sohal SK, Kesavan AK, Samiksha. Development of mitochondrial replacement therapy: A review. *Heliyon* [Internet]. 14 sept 2020;6(9):e04643-e04643. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32984570>
- [246] Hershlag A, Bristow SL. Editing the human genome: where ART and science intersect. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2018/06/07 éd. août 2018;35(8):1367-70. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29882090>
- [247] Burkard C, Lillico SG, Reid E, Jackson B, Mileham AJ, Ait-Ali T, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog* [Internet]. 23 févr 2017;13(2):e1006206-e1006206. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28231264>
- [248] Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S, et al. Generation of gene-targeted dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol* [Internet]. 1 déc 2015 [cité 14 déc 2021];7(6):580-3. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv061>
- [249] Hübner A, Petersen B, Keil GM, Niemann H, Mettenleiter TC, Fuchs W. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Sci Rep* [Internet]. 23 janv 2018;8(1):1449. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19626-1>
- [250] SCIENCE. CRISPR cas9 modified piglets. 22 sept 2017;357(6357). Disponible sur: <https://www.science.org/toc/science/357/6357>

- [251] Tina Hesman Saey. Muscle-gene edit creates buff beagles [Internet]. sciencenews. 2015. Disponible sur: <https://www.sciencenews.org/article/muscle-gene-edit-creates-buff-beagles>
- [252] Maxwell Mehlman. Governing Non-Traditional Biology [Internet]. 2019 [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/petrieflom/maxwell-mehlman-governing-nontraditional-biology>
- [253] Ikemoto LC. DIY Bio: Hacking Life in Biotech's Backyard. 2017;51:30.
- [254] Zettler PJ, Guerrini CJ, Sherkow JS. Finding a Regulatory Balance for Genetic Biohacking. SSRN Electron J [Internet]. 2019 [cité 15 déc 2021]; Disponible sur: <https://www.ssrn.com/abstract=3490006>
- [255] Biosafety Levels [Internet]. Public Health Emergency. 2015 [cité 15 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.phe.gov/s3/BioriskManagement/biosafety/Pages/Biosafety-Levels.aspx>
- [256] Pearlman A. My body, my genes. New Sci [Internet]. 18 nov 2017;236(3152):22-3. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0262407917322571>
- [257] Josiah Zayner PhD. Who is Josiah Zayner? [Internet]. [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <http://www.josiahzayner.com/p/about.html>
- [258] ODIN. Frog Engineering Kit [Internet]. 2019 [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.the-odin.com/frog-ge-kit/>
- [259] Lee, S.M. "This Guy Says He's The First Person to Attempt Editing His DNA with CRISPR." BuzzFeed. News. 14 oct 2017; Disponible sur: <https://www.buzzfeednews.com/article/stephaniemlee/this-biohacker-wants-to-edit-his-own-dna#.evELlvD9p>

- [260] Zayner, J. “True Story: I Injected Myself With a CRISPR Genetic Enhancement.” *Antisense* [Internet]. 2018 [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <http://theantisense.com/2018/11/13/true-story-i-injected-myself-with-a-crispr-genetic-enhancement/>
- [261] He Z, Zhang T, Jiang L, Zhou M, Wu D, Mei J, et al. Using CRISPR/Cas9 Technology Efficiently targeted of Goat Myostatin through Zygotes Microinjection result in double-muscléd phenotype in goats. *Biosci Rep.* sept 2018;38: BSR20180742.
- [262] Emily Mullin. A biotech CEO explains why he injected himself with a DIY herpes treatment on Facebook Live [Internet]. *MIT Technology Review*. 2018 [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.technologyreview.com/s/610179/a-biotech-ceo-explains-why-he-injected-himself-with-a-diy-herpes-treatment-live-on-stage/>
- [263] CompoZr™ Custom Zinc Finger Nuclease (ZFN) [Internet]. *Sigmaaldrich.com*. [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/MA/fr/product/sigma/cstzfn>
- [264] Gaj T, Perez-Pinera P. The continuously evolving CRISPR barcoding toolbox. *Genome Biol.* sept 2018;19.
- [265] DiEuliis D, Berger K, Gronvall G. Biosecurity Implications for the Synthesis of Horsepox, an Orthopoxvirus. *Health Secur* [Internet]. 1 déc 2017 [cité 15 déc 2021];15(6):629-37. Disponible sur: <https://doi.org/10.1089/hs.2017.0081>
- [266] DiEuliis D, Giordano J. Why Gene Editors Like CRISPR/Cas May Be a Game-Changer for Neuroweapons. *Health Secur* [Internet]. 2017/06/02 éd. juin 2017;15(3):296-302. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28574731>
- [267] Gibson Daniel G., Glass John I., Lartigue Carole, Noskov Vladimir N., Chuang Ray-Yuan, Algire Mikkel A., et al. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science* [Internet]. 2 juill 2010 [cité 15 déc 2021];329(5987):52-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1126/science.1190719>

- [268] National Academies of Sciences E and Medicine. *Biodefense in the Age of Synthetic Biology* [Internet]. Washington, DC: The National Academies Press; 2018. Disponible sur: <https://www.nap.edu/catalog/24890/biodefense-in-the-age-of-synthetic-biology>
- [269] Cyranoski D. CRISPR-baby scientist fails to satisfy critics. *Nature*. nov 2018;564.
- [270] Andrew Joseph. CRISPR Babies Scientist Sentenced to 3 Years in Prison A Chinese Court jailed He Jiankui for an “illegal medical practice” in editing embryos’ DNA [Internet]. *Scientific American*. 2019 [cité 15 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.scientificamerican.com/article/crispr-babies-scientist-sentenced-to-3-years-in-prison/>
- [271] WHO 2019. WHO expert advisory committee on developing global standards for governance and oversight of human genome editing: report of the second meeting [Internet]. Genève; 2019 sept [cité 15 déc 2021] p. 17. Report No.: WHO/SCI/RFH/2019.02. Disponible sur: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-SCI-RFH-2019-02>
- [272] Burt A, Crisanti A. Gene Drive: Evolved and Synthetic. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2018/02/05 éd. 16 févr 2018;13(2):343-6. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29400944>
- [273] Genevieve Rajewski. Fighting Lyme disease with gene editing Research. MIT media lab [Internet]. 24 janv 2019; Disponible sur: <https://www.media.mit.edu/articles/fighting-lyme-disease-with-gene-editing/>
- [274] Tripathi JN, Ntui VO, Ron M, Muiruri SK, Britt A, Tripathi L. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Commun Biol* [Internet]. 31 janv 2019;2(1):46. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0288-7>
- [275] Callaway E. Controversial CRISPR ‘gene drives’ tested in mammals for the first time. *Nature*. juill 2018;559.

- [276] Collins CM, Bonds J, Quinlan M, Mumford JD. Effects of removal or reduced density of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* s.l., on interacting predators and competitors in local ecosystems. *Med Vet Entomol.* juill 2018;33.
- [277] Building the Safe Genes Toolkit-Seven teams aim to develop new knowledge and tools to support responsible innovation in gene editing and protect against threats to genome integrity [Internet]. DEFENSE ADVANCED RESEARCH PROJECTS AGENCY-DARPA. 2017. Disponible sur: <https://www.darpa.mil/news-events/2017-07-19>



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
 - *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

قسم الصيدلي



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أَقْسَمُ بِاللَّهِ الْكَبِيرِ

- أن أراقب الله في مهنتي

- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف

لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.

- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية،

وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته

الإنسانية.

- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب

السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.

- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء

القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق

أو تشجيع الأعمال الإجرامية.

- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف

زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

وَاللَّهِ عَلَىٰ مَا أَقُولُ شَهِيدٌ



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس بالرباط
كلية الطب والصيدلة
الرباط



جامعة محمد الخامس بالرباط
Université Mohammed V de Rabat

أطروحة رقم: 09

سنة : 2022

العلاج الجيني وتكنولوجيا كريسبر

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : / / 2022

من طرف

السيدة فاطمة الزهراء الهاشمي

المزودة في 04 فبراير 1998 بالدار البيضاء

لنيل شهادة

دكتور في الصيدلة

الكلمات الأساسية : العلاج الجيني؛ كريسبر؛ الجينوم؛ الحمض النووي

أعضاء لجنة التحكيم:

رئيس	السيد جواد الحارثي أستاذ في الكيمياء العلاجية
مشرف	السيد عز الدين إبراهيمي أستاذ في علم الأحياء الجزيئية
عضوة	السيدة منى أودغيري أستاذة في علم الأحياء الدقيقة
عضوة	السيدة نعيمة الحافظي أستاذة في طب الأطفال