

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2016

THESE N°: 75

**LES PRINCIPES DE LA THERAPIE GENIQUE
ET SES APPLICATIONS DANS LES GENODERMATOSES**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mr. Asaad EL BAKKARI
Né le 05 Octobre 1990 à Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Médecine

MOTS CLES : Thérapie génique – Génodermatoses – Enfant – Perspectives d’avenir.

JURY

Mr. A. BENTAHILA

Professeur de Pédiatrie

Mme. F. JABOUIRIK

Professeur de Pédiatrie

Mme. S. EL HAMZAOU

Professeur de Microbiologie

Mme. Z. BERNOUSSI

Professeur d’Anatomie Pathologique

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

سورة البقرة الآية 31

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

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 Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS
ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid*	Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
-------------------------	----------------------

Novembre 1983

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI	Rhumatologie
-------------------------------	--------------

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <i>Clinique Royale</i>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
Pr. BENSaid Younes	Pathologie Chirurgicale
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYA OUI Mohamed

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne – **Doyen de la FMPR**
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – **Doyen de la FMPO**
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – **Dir. du Centre National PV**
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne

Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAoui Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia

Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie **Inspecteur du SS**
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation – **Dir. HMIM**
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur ERSM**
Urologie
Ophtalmologie

Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAQUIR Souad*
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Radiologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Gastro-Entérologie
Neurologie – *Doyen Abulcassis*
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR 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. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie
Anesthésie-Réanimation

Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
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. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil
Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
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. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phthisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale

Pr. MIKDAME Mohammed*
 Pr. MOHSINE Raouf
 Pr. NOUNINI Yassine
 Pr. SABBAAH Farid
 Pr. SEFIANI Yasser
 Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 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. BICHRA Mohamed Zakariya*
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. EL MANSARI Omar*
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie

Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHABOUZE Samira
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. LEZREK Mohammed*
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Nouredine*
 Pr. BAHIRI Rachid
 Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENHALIMA Hanane
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
 Pr. HAJJI Leila
 Pr. HESSISSEN Leila
 Pr. JIDAL Mohamed*
 Pr. LAAROUSSI Mohamed
 Pr. LYAGOUBI Mohammed
 Pr. NIAMANE Radouane*
 Pr. RAGALA Abdelhak
 Pr. SBIHI Souad
 Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie (mise en disponibilité)
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 Pr. AKJOUJ Said*
 Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 Pr. BENCHEIKH Razika
 Pr. BIYI Abdelhamid*

Rhumatologie
 Radiologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique

Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 Pr. DOGHMI Nawal
 Pr. ESSAMRI Wafaa
 Pr. FELLAT Ibtissam
 Pr. FAROUDY Mamoun
 Pr. GHADOUANE Mohammed*
 Pr. HARMOUCHE Hicham
 Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 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. SEKKAT Fatima Zahra
 Pr. SOUALHI Mouna
 Pr. TELLAL Said*
 Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
 Pr. ACHACHI Leila
 Pr. ACHOUR Abdessamad*
 Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
 Pr. AMHAJJI Larbi*
 Pr. AMMAR Haddou*
 Pr. AOUI Sarra
 Pr. BAITE Abdelouahed*
 Pr. BALOUCH Lhousaine*
 Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GANA Rachid
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia

Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale
 Pneumo phtisiologie
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 ORL
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation
 Biochimie-chimie
 Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Neuro chirurgie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie

Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MOUTAJ Redouane *
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. AZENDOUR Hicham*
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BIIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*

Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologie
 Parasitologie
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique

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. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. ZOUHAIR Said*

Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Microbiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie
 Microbiologie

PROFESSEURS AGREGES :
Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 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. LEZREK Mounir
 Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Ophtalmologie
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie
 Anatomie pathologique

Mai 2012

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

Chirurgie Pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Traumatologie Orthopédique

Pr. DRISSI Mohamed*
 Pr. EL ALAOU MHAMDI Mouna
 Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
 Pr. EL OUAZZANI Hanane*
 Pr. ER-RAJI Mounir
 Pr. JAHID Ahmed
 Pr. MEHSSANI Jamal*
 Pr. RAISSOUNI Maha*

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumophtisiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie pathologique
 Psychiatrie
 Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
 Pr. AIT EL CADI Mina
 Pr. AMRANI HANCHI Laila
 Pr. AMOUR Mourad
 Pr. AWAB Almahdi
 Pr. BELAYACHI Jihane
 Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
 Pr. BENCHEKROUN Laila
 Pr. BENKIRANE Souad
 Pr. BENNANA Ahmed*
 Pr. BENSEFFAJ Nadia
 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 JOUDI 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 Meryim
 Pr. GHANIMI Zineb
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed*
 Pr. LATIB Rachida

Pharmacologie – Chimie
 Toxicologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Réanimation Médicale
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie-Chimie
 Hématologie
 Informatique Pharmaceutique
 Immunologie
 Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chimie Analytique
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie
 Cardiologie
 Réanimation Médicale
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Neuro-Chirurgie
 Médecine Nucléaire
 Chimie Thérapeutique
 Toxicologie
 Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Pédiatrie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie

Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUY 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*
 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*

Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 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*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

**Enseignants Militaires*

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia
 Pr. ALAMI OUHABI Naima
 Pr. ALAOUI KATIM
 Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
 Pr. ANSAR M'hammed
 Pr. BOUHOUCHE Ahmed
 Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
 Pr. BOURJOUANE Mohamed
 Pr. BARKYOU Malika
 Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
 Pr. DAKKA Taoufiq
 Pr. DRAOUI Mustapha
 Pr. EL GUESSABI Lahcen

Physiologie
 Biochimie – chimie
 Pharmacologie
 Histologie-Embryologie
 Chimie Organique et Pharmacie Chimique
 Génétique Humaine
 Applications Pharmaceutiques
 Microbiologie
 Histologie-Embryologie
 Biochimie – chimie
 Physiologie
 Chimie Analytique
 Pharmacognosie

Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbès
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRIS Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Zootéchnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biologie moléculaire
Biologie
Chimie Organique
Chimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

*Mise à jour le 09/01/2015 par le
Service des Ressources Humaines*

- 9 JAN 2015





Dédicaces

A Mes très chers parents

A mes amis

A ma fiancée

Aux enfants de la lune

Aux enfants souffrant d'épidermolyses bulleuses

Aux enfants souffrant d'ichtyose

Et à tous les enfants souffrant une pathologie incurable



Remerciements

A

Notre Maître et Président de Jury

Mr le Professeur A. BENTAHIL A,

Professeur de Cardiologie pédiatrique et chef de

Service de pédiatrie IV de l'hôpital d'enfants de Rabat

Vous me faites un grand honneur en acceptant de présider mon jury de thèse.

Je vous remercie très vivement de la bienveillance et de l'attention dont vous m'entourez.

Veillez trouver dans ce travail, l'expression de mon profond respect et mes vifs remerciements

A

Notre maître et Rapporteur de thèse

Madame le professeur F. JABOURIK

Professeur de Dermato pédiatrique

au Service de Pédiatrie IV de l'hôpital d'enfants de Rabat

Pour vos propositions judicieuses, inhérentes au choix du sujet de cette thèse.

Pour les efforts inlassables que vous avez déployés pour que ce travail soit élaboré.

Pour votre douceur, votre soutien indéfectible et votre compétence à toutes les étapes de ce travail. Veuillez accepter mes sincères remerciements de même que le témoignage de mon profond respect.

A

Notre maître et juge

Madame Le Professeur S. EL.HAMZAOUI

Professeur de Microbiologie à la faculté de médecine

Et de Pharmacie de Rabat

Je suis très touchée par l'extrême courtoisie de votre accueil et par l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ma thèse.

Veillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de mon respect et de ma profonde gratitude.

A

Notre maître et juge

Madame Le Professeur Z.BERNOUSSI

Professeur d'anatomie pathologique à la faculté

de médecine et de pharmacie de Rabat

*Je suis profondément reconnaissant de l'honneur que vous me faites
en acceptant de juger ce travail.*

*J'ai apprécié votre accueil bienveillant, votre gentillesse ainsi que
votre compréhension.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma grande
attention et mon profond respect*



Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : consequences de l'integration d'un transgene au sein d'un genome hote d'apres hackett et al. (2007)	8
figure 2 : recombinaison homologue. a : spontanee, b : intervention d'une nuclease en doigts de zinc, d'apres pessach et notarangelo (2011)	10
Figure 3: Correspondance Rvd / Nucleotide	12
Figure 4: Structure Et Mise En Place Des Talen Sur L'adn D'apres Valton (2014)	12
Figure 5: Fonctionnement Schematic Du Systeme Crispr	14
Figure 6: Schema De La Synthese Des Microarn D'apres Arbuthnot Et Thompson (2008)	16
Figure 7: Mecanisme D'action Des Siarn, D'apres Li Z. Et Rana (2011) (19)..	18
Figure 8: : Schematisation De L'experience Menee Par Brown Et Son Equipe	19
Figure 9: A. Liaisons Watson-Crick, B. Liaisons Hoogsteen, D'apres Ghosal Et Al. (2006)	22
Figure 10: : Mecanismes Des Systemes « Tet Off » / « Tet On » D'apres Naidoo Et Young (2012)	26
Figure 11: Concept De Therapie Genique In Vivo Et Ex Vivo D'apres Kaufmann Et Al. (2013)	28
Figure 12: Mode De Penetration De L'adenovirus Had5 D'apres Coughlan Et Al. (2010)	31

Figure 13: Cycle De Vie Des Retrovirus D'apres Spencer Et Palmarini (2012)	36
Figure 14: Representation Des Barrieres Qui Limitent L'utilisation De Vecteurs Non Viraux In Vivo D'apres Al-Dosari Et Gao (2009)	41
Figure 15: Combinaisons A Base De Nanotubes De Carbone Etudiees D'apres Bates Et Kostarelos (2013)	47
Figure 16: Schematisation De La Reaction Des Microbulles Aux Ultrasons D'apres Lentacker Et Al. (2013)	54
Figure 17: Effets Physiques De La Cavitation Stable D'apres Lentacker Et Al. (2013)	55
Figure 18: Effets Physiques De La Cavitation Inertielle D'apres Lentacker Et Al. (2013)	56
Figure 19: Schematisation Du Fonctionnement D'un Vecteur Magnetique Codant Pour L'expression D'une Proteine Fluorescente D'apres Zheng Et Al. (2012)	58
Figure 20: Schematisation Du Fonctionnement D'un Systeme Transposon /Transposase D'apres (Skipper, 2013)	60
Figure 21: Classification Des Epidermolyses Bulleuses	65
Figure 22: Epidermolyse Bulleuse Simple Forme Koebener(Her)	66
Figure 23: Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle Forme Herlitz(Her)	67
Figure 24: Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle Aculaire (Her)	68
Figure 25: Les Lésions Cicatricielles Avec Grains De Miliun (Her)	69

Figure 26: Structure Du Collagene	71
Figure 27: Therapie Ex Vivo De Keratinocytes	85
Figure 28: Stade De Debut De Xeroderma Pigmentosum(Her).	88
Figure 29: Xeroderma Pigmentosum (Stade De L'erytheme Persistant S'accompagnant De Macules Achromiques) (Her).	89
Figure 30: Stade Depasse De Xeroderma Pigmentosum Avec Cancer Cutane(Her).	90
Figure 31: Obtention Des Cellules Ipscs (Induced Pluripotent Cells)	99
Figure 32 Nourrisson Presantant Un Syndrome De Netherton.....	104
Figure 33: Bebe Rouge Ou Syndrome De Netherton Chez Un Nourrisson	104

Liste des abréviations

EBS	: Epidermolyse bulleuse simple
EBJ	: Epidermolyse bulleuse jonctionnelle
RDEB	: Recessive dystrophic epidermolysis bullosa
C7	: COL7A1
JDE	: jonction dermo-épidermique
ZNF	: nuclease zinc fingers
ARNm	: ARN messagé
ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
Kb	: kilobases
SIN	: self-inactivating
NILV	: Non-Integrating Lenti-viruses
FDA	: Food and drugs association
TALEN	: transcription activator-like effector nucleases
AC	: adényl cyclase
CAR	: récepteur aux coxakievirus et adénovirus
CMV	: cytomégalovirus
CPA	: cellule présentatrice d'antigène
CRISPR	: clustered regulary interspaced short palindromic repeats
CXCR	: récepteurs aux chémokines

LTR	: long terminal repeat
PEI	: polyéthylénimine
RISC	: complexe d'extinction induit par l'ARN
Rnase	: Ribonucléase
siARN	: short interfering ARN
VSV	: virus de la stomatite vésiculeuse



Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Les principes de la thérapie génique	5
I. Lignée germinale versus lignée somatique	6
II. Modalités d'utilisation de la thérapie génique.....	7
A. Addition d'un gène.....	7
B. Réparation des gènes	9
C. Modification de l'expression des gènes.....	14
1. Extinction génique	14
a. Interférence de l'ARN	14
b. ARN anti-sens	20
c. Ribozymes et ADNzymes (ou désoxyribozymes)	21
d. Autres molécules régulatrices	21
2. Expression forcée.....	23
3. Autres modifications.....	24
III. Modalités d'administration de la thérapie génique	24
A. In vivo	24
B. Ciblage de l'expression du transgène.....	25
C. Ex vivo.....	27
IV. Les vecteurs	29
A. Les vecteurs viraux.....	29
1. Les Adénovirus.....	30
2. Les Adeno-Associated virus.....	33
3. Les Retroviridae	34
a. Les rétrovirus simples.....	37
b. Les lentivirus Au sein des retroviridae.....	38
B. Les vecteurs non-viraux.....	40
1. Les vecteurs chimiques	42
a. Les lipides cationiques	42
b. Les polymères cationiques.....	43
c. Les polymères biodégradables.....	44

d. Les nanotubes de carbone	46
e. Autres nanoparticules non virales	47
2. Les acides nucléiques nus	49
a. Micro injection.....	50
b. Gene gun.....	50
c. Technique hydrodynamique	51
d. Electroporation.....	52
e. Nucléofection.....	52
f. Sonoporation.....	53
C. Perspectives d'améliorations	57
1. Les nanoparticules magnétiques.....	57
2. Les systèmes transposon/transposase Sleeping Beauty	60
3. Les aptamères	61
Chapitre II : L'application de la thérapie génique dans les génodermatoses.....	63
A. La thérapie génique dans l'épidermolyse bulleuse dystrophique	70
1. Transfection par plasmide d'ADN.....	72
2. Transduction virale et à médiation de phage.....	73
3. Edition de gènes.....	77
4. Livraison thérapeutique des cellules autologues corrigé pour RDEB.....	81
B. Thérapie génique dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle	83
A. Thérapie génique ex vivo.....	91
B. Les approches de la thérapie génique ciblée : Utilisation des méganucléases pour la correction des cellules XPC	96
C. Effets potentiels des adjuvants de la réparation de l'ADN	97
D. Utilisation de cellules pluripotentes induites (iPSC) comme agents de thérapie génique.....	98
E. Utilisation topique de la T4 endonucléase.....	100
Conclusion	106
Résumés	109



Introduction

La thérapie génique est une biotechnologie basée sur le transfert de matériel génétique. Elle consiste à utiliser une séquence d'acides nucléiques (le plus souvent un gène, appelé transgène) afin de traiter une maladie ou ses symptômes.

Cette séquence est insérée dans les cellules du sujet malade (qu'on appelle alors cellules transfectées) afin qu'elles produisent elles-mêmes le médicament à effet thérapeutique.

Pour réaliser cela, on construit une séquence d'acides nucléiques, appelée cassette génique, via des techniques de recombinaison de l'ADN. On y insère le transgène et tout ce qui sera nécessaire à la cellule cible afin qu'elle puisse l'exprimer (promoteur, autres séquences régulatrices, etc...).

Cette cassette génique est ensuite prise en charge par un vecteur qui va la délivrer au sein des noyaux des cellules d'intérêt. On peut aussi utiliser, à la place d'une cassette génique, d'autres types d'acides nucléiques comme des ARN créés par synthèse chimique.

Le concept de thérapie génique n'est pas récent. Dès les années 70, avec l'exploration et la cartographie du génome humain, on pense qu'il est possible de guérir d'une maladie génétique en modifiant les allèles mutés (réparation de la mutation ou adjonction de l'allèle sauvage) - (1)

La technique de transfert génétique in vitro est maîtrisée dans les années 80. La recherche en thérapie génique se tourne donc en premier lieu vers les syndromes d'immunodéficience congénitaux ou héréditaires. En effet, dans ces maladies, les cellules atteintes sont des cellules circulantes, qu'on peut prélever, mettre en culture et réinjecter après transfection.

Les premiers vecteurs à avoir été utilisés sont les rétrovirus en raison de leur capacité à insérer leur génome de façon stable dans les cellules qu'ils infectent. Le premier essai clinique approuvé a lieu en 1991.

Il concerne un syndrome d'immunodéficience, la déficience en adénosine désaminase qui est une enzyme nécessaire au métabolisme des purines. Cet essai clinique implique deux patients. Le vecteur utilisé est un rétrovirus transportant le gène pour l'adénosine désaminase. Les résultats sont mitigés mais l'essai clinique ne met en évidence aucun effet secondaire.

La recherche en thérapie génique est fortement remise en question lors d'un autre essai clinique conduit en 1999 : des enfants immunodéficients (atteints d'immunodéficience combinée sévère liée au chromosome X) sont traités par thérapie génique via un vecteur rétroviral.

Les premiers résultats sont très encourageants (reconstitution d'une population immunitaire normale), mais trois ans après l'essai clinique, deux des enfants traités développent une leucémie dont on détermine qu'elle est due à l'insertion du transgène dans le génome des cellules souches sanguines. L'un des deux décède des suites de sa leucémie – (2).

A partir de ce moment-là, les recherches en thérapie génique se portent vers d'autres vecteurs afin de mieux contrôler le lieu d'insertion du transgène.

Malgré cet échec, la thérapie génique s'est bien développée dans différents domaines.

Aujourd'hui, la thérapie génique est appliquée à de nombreuses maladies, (3) génétiques comme acquises, telles que l'insuffisance cardiaque, le SIDA et les cancers.

L'application de la thérapie génique aux maladies acquises repose sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la maladie et l'identification de cibles pouvant être modifiées par modulation de l'expression génique.

Les principes de la thérapie génique seront présentés dans une première partie afin de présenter les stratégies et les techniques nécessaires à la mise en place d'un traitement de thérapie génique.

Nous verrons que plusieurs paramètres sont à prendre en compte avant de créer un traitement de thérapie génique. Il faut choisir le type de modification à apporter au génome, les modalités d'administration ainsi que le vecteur qui transportera la cassette génétique.

Nous illustrerons ensuite ces principes et leur application dans les génodermatoses.

*Chapitre I : Les principes
de la thérapie génique*

Nous décrirons dans cette partie les notions de base nécessaires à la compréhension du fonctionnement de la thérapie génique.

I. Lignée germinale versus lignée somatique

La thérapie génique a été créée pour pouvoir s'appliquer à toutes les cellules eucaryotes, aux cellules germinales comme aux cellules somatiques. Par transfection des cellules de la lignée germinale, il serait possible d'éliminer certaines maladies de la descendance des sujets traités.

S'il est théoriquement possible de le réaliser, cela soulève trop de problèmes éthiques pour que la recherche s'y intéresse vraiment et lève les barrières technologiques actuelles.

Pour le moment, la thérapie génique humaine intéresse exclusivement les cellules somatiques. Les techniques de thérapie génique germinale sont uniquement utilisées en transgénèse animale, chez les modèles animaux, afin de créer de contrôler leur génotype pour les besoins de la recherche – (3) .

Un décret interdisant la thérapie génique germinale humaine a été édité par le Conseil de l'Europe en 1991 mais chaque pays possède sa propre législation à ce sujet.

Par exemple, en Allemagne, l'utilisation de la thérapie génique sur les cellules germinales est considérée comme un crime (4).

A l'opposé, la FDA (Food and Drug Administration, équivalent nord-américain de l'ANSES) a autorisé l'utilisation de la thérapie génique sur la lignée germinale aux Etats-Unis.

II. Modalités d'utilisation de la thérapie génique

A. Addition d'un gène

L'addition d'un gène consiste à insérer dans le noyau cellulaire ou directement dans le génome de la cellule hôte un nouveau gène, qu'on appelle transgène.

Dans la plupart des cas, l'expression du transgène permet à la cellule de produire son propre « médicament », cette méthode ne fonctionne que si la maladie est due à une protéine non ou peu fonctionnelle.

Le transgène peut rester en dehors du génome : il se comporte alors comme un épisode, se réplique de façon indépendante, mais peut être perdu lors des divisions cellulaires, Ou bien il peut être inséré dans le génome par le vecteur.

Il est alors important de pouvoir contrôler le site d'insertion (par exemple dans un « safe-harbor » c'est-à-dire, une région de l'ADN qui peut être modifiée sans crainte de provoquer des mutations) afin de ne pas modifier des gènes fonctionnels – (2)– (5).

La figure 1 présente les différentes possibilités d'intégration du transgène et leurs conséquences.

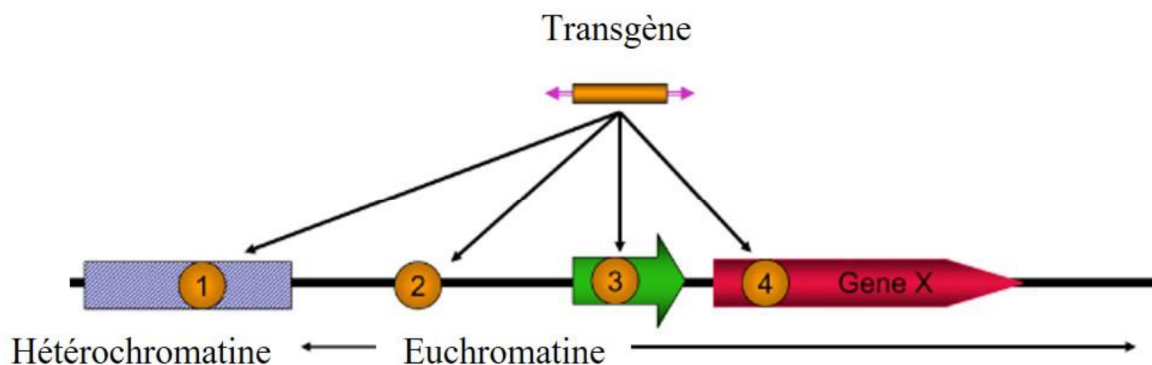


Figure 1 : Conséquences de l'intégration d'un transgène au sein d'un génome hôte d'après HACKETT et al. (2007) (6)

1. L'intégration au sein de l'hétérochromatine ne permet généralement pas l'expression du transgène et n'a aucune conséquence sur le génome de l'hôte.
2. L'intégration au sein de l'euchromatine, entre les gènes est la situation idéale. Le transgène peut s'exprimer sans modification de l'expression du génome de l'hôte.
3. L'intégration au sein d'une région régulatrice de la transcription peut avoir plusieurs conséquences. Le transgène s'exprime dans la majorité des cas mais son expression peut être modifiée par les éléments régulateurs environnants. En parallèle, les éléments régulateurs présents dans la cassette génique peuvent modifier l'expression des gènes environnants voire empêcher l'expression d'un gène actif.
4. L'intégration au sein d'une région transcrite d'un gène (ici, gène X) permet l'expression du transgène mais peut bloquer l'expression du gène X ou provoquer la production d'une protéine mutée à partir de ce gène.

Les situations 3 et 4 sont les plus dangereuses car elles peuvent conduire à de graves mutations et à l'apparition de cellules tumorales. Il est donc crucial de pouvoir contrôler les sites d'insertion des transgènes par l'étude et la sélection des vecteurs.

B. Réparation des gènes

La réparation des gènes consiste à utiliser une séquence d'ADN ou d'ARN pour modifier le génome de la cellule hôte et corriger l'anomalie d'expression du gène à l'origine de la maladie.

Plusieurs techniques utilisant l'allèle entier sont à l'étude – (2):

- Remplacement de l'allèle muté par recombinaison homologue spontanée avec l'allèle normal. Dans ce cas, on injecte dans les cellules cibles des allèles sauvages sans autre molécule pour aider à la recombinaison homologue. Cependant, la fréquence de recombinaison homologue spontanée est très faible (inférieure à 1/10⁶ cellules modifiées).

(Figure 2, A)

- Remplacement des deux allèles par insertion d'une séquence d'ADN double brin sur le même locus pour permettre une régulation normale du transgène. On utilise alors des endonucléases endogènes, des nucléases en doigts de zinc (cf. Figure 2, B) ou des enzymes synthétiques, spécifiques d'une région de l'ADN afin de cibler le locus, exciser les allèles endogènes et les remplacer par les allèles sauvages. La régulation du gène est donc conservée.

Il existe aussi des méthodes de remplacement d'un seul nucléotide par recombinaison homologue avec des oligonucléotides. Les oligonucléotides synthétiques ne diffèrent de la séquence génétique ciblée que par quelques bases

azotées (une à cinq) afin de garantir la possibilité d'une recombinaison homologue. La modification du génome cible est alors réalisée par le système endogène de réparation de l'ADN – (7).

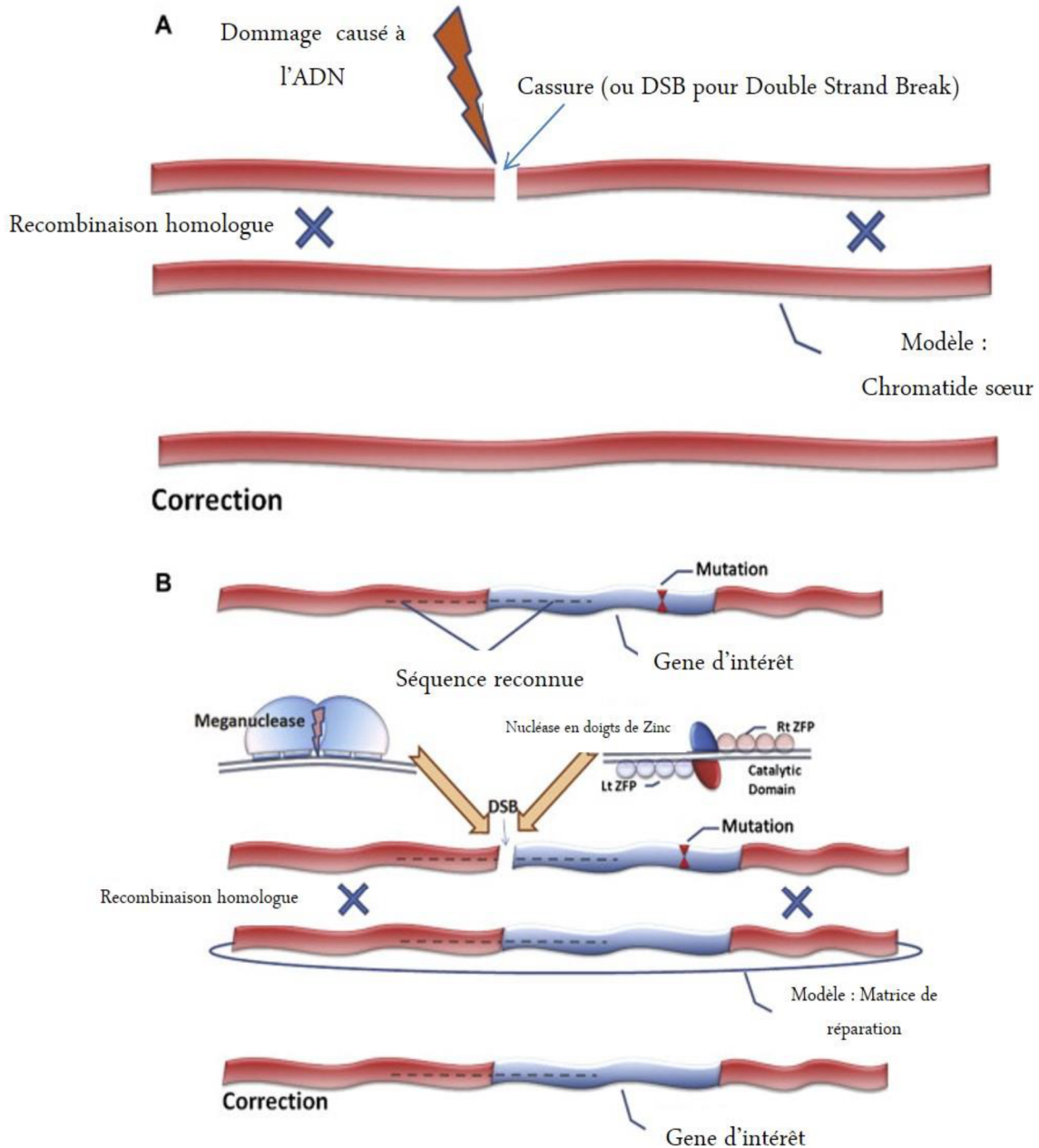


Figure 2 : Recombinaison homologue. A : spontanée, B : Intervention d'une nucléase en doigts de Zinc, D'après PESSACH et NOTARANGELO (2011) (2)

D'autres systèmes de clivage spécifique de l'ADN/ARN sont à l'étude et pourront être utilisés à terme en thérapie génique comme les enzymes en doigts de zinc.

Ces systèmes sont actuellement utilisés en ingénierie des génomes. On peut citer par exemple les « transcription activator-like effector nucleases » (TALEN) et les « clustered short palindromic repeats » (CRISPR).

Les **TALEN** sont des protéines chimériques contenant un domaine capable de se lier à l'ADN de manière spécifique (appelé TALE) et un domaine catalytique non spécifique (une nucléase).

Le domaine se liant à l'ADN est dérivé de protéines appelées TALE pour la transcription Activator-Like Effectors présentes chez les bactéries du genre *Xanthomonas*.

Ces bactéries sont des parasites végétaux ; les TALE leur permettent d'induire l'expression de certains gènes chez leur hôte.

Le domaine se liant à l'ADN des TALE est composé de 13 à 28 unités de répétition de 34 acides aminés chacune. Ces unités de répétition ne se différencient que par deux résidus cruciaux en position 12 et 13 (appelés repeat variable di-residue ou RVD) qui déterminent le nucléotide auquel l'unité se lie.

Il est cependant nécessaire que le premier nucléotide reconnu soit une thymine (appelée T0) pour permettre l'activité des TALE.

La figure 3 montre le code de correspondance entre les résidus et les nucléotides.

Résidus cruciaux (RVD)



Nucléotide correspondant

Figure 3: Correspondance RVD / nucléotide d'après (8).

Légende

H : Histidine

G : Glycine I

D : Acide aspartique

I : Isoleucine

N : Asparagine

Le site catalytique est issu de la nucléase FokI isolée chez la bactérie *Flavobacterium okeanoikoites*. Cette nucléase fonctionnant en dimère afin de pouvoir créer une cassure sur les deux brins de l'ADN, les TALENs vont toujours par paire et reconnaissent deux séquences d'ADN distantes de 14 à 30 nucléotides (séquence « espace »).

La figure 4 schématise la structure des TALEN.

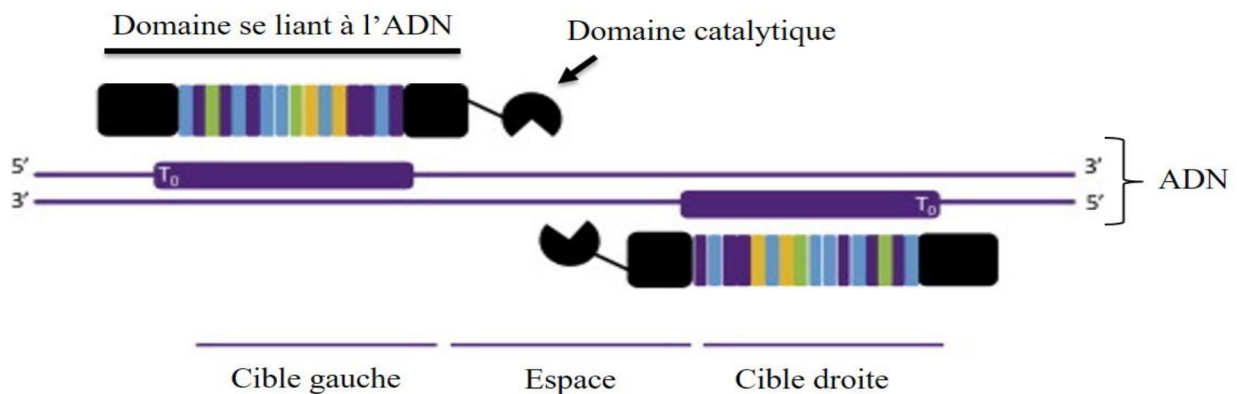


Figure 4: Structure et mise en place des TALEN sur l'ADN d'après VALTON (2014) (8)

Il semblerait que les TALEN soient plus spécifiques que les enzymes en doigts de zinc : leur code de liaison à l'ADN est simple et le nombre des unités de répétition peut être augmenté afin de garantir la spécificité du site de clivage – (9)– (10).

Les **CRISPR** sont des séquences d'ADN non codantes. Elles appartiennent au système de défense immunitaire des bactéries et des archées. Lors d'une infection par un virus ou un bactériophage, il y a insertion d'une séquence d'ADN étrangère au génome de la bactérie ou de l'archée ce qui active les CRISPR. Le système CRISPR fonctionne en trois phases – (11):

- Premièrement, il faut qu'il y ait insertion de l'ADN étranger au sein de la séquence des CRISPR.
- Cette insertion déclenche la transcription des CRISPR en ARN (appelés crARN) par des protéines associées aux CRISPR ou Cas.
- D'autres protéines Cas prennent en charge les crARN et forment un complexe capable de dégrader l'ADN étranger.

La figure 5 montre le fonctionnement schématique du système CRISPR.

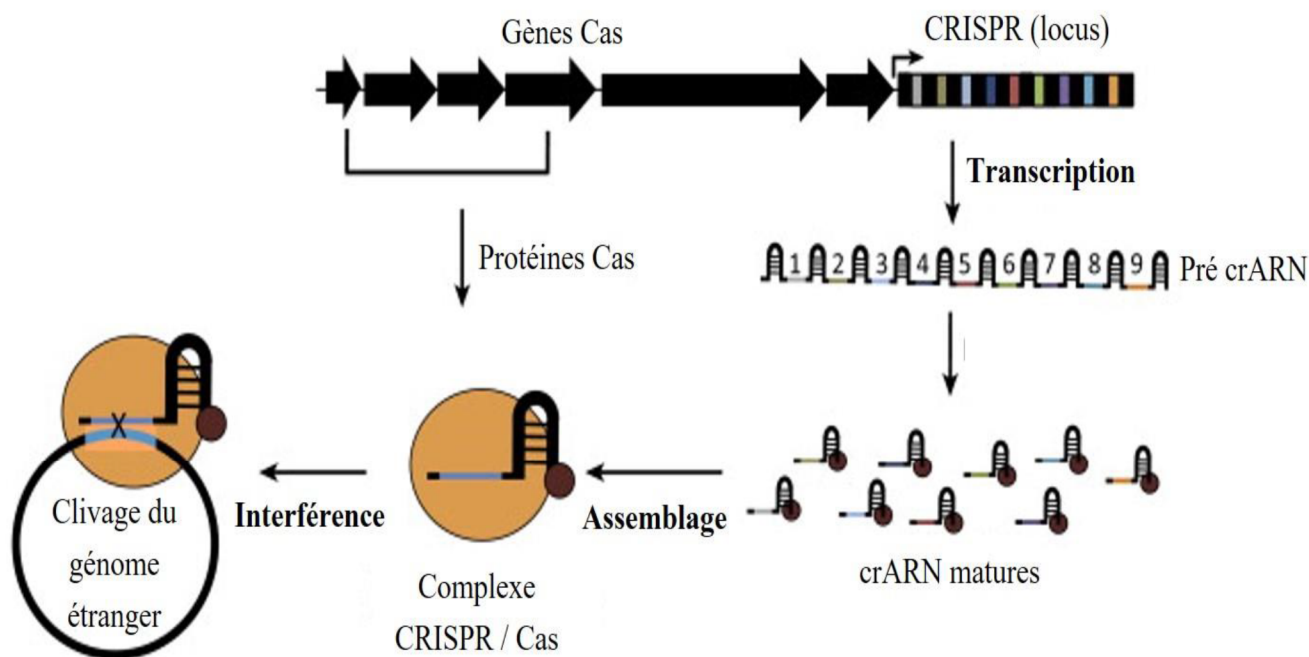


Figure 5: Fonctionnement schématique du système CRISPR, d'après (12)

Il est donc possible de modifier ces systèmes pour diriger l'action de dégradation vers le site de la mutation responsable de la maladie – (13) .

C. Modification de l'expression des gènes

Il est aussi possible de modifier l'expression des gènes en les empêchant de s'exprimer ou en forçant leur expression.

1. Extinction génique

a. Interférence de l'ARN

L'interférence de l'ARN est un mécanisme de régulation de l'expression génique présent chez de nombreux eucaryotes. L'interférence de l'ARN provoque la dégradation d'un ARNm cible par une enzyme dirigée par un ARN non codant, complémentaire de l'ARNm cible. Ce mécanisme a été découvert en 1998 par Fire et son équipe – (14).

Cette équipe a mis en évidence le potentiel des ARN dans l'extinction génique en injectant des ARN double brin chez des nématodes (*Caenorhabditis elegans*). On a découvert en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* le premier micro ARN appelé l'ARN lin-4 – (15).

Ces micros ARN interviennent dans différents processus cellulaires comme la mitose, l'apoptose et le développement des différents tissus (cerveau, cœur, ...) ainsi que dans le mécanisme d'interférence de l'ARN. On en dénombre plus de 500 chez l'Homme et les chercheurs suspectent qu'il en existe plus d'un millier – MARQUEZ et McCAFFREY (2008) (16).

Les gènes du micro ARN appartiennent à la partie non codante du génome. Un premier primicroARN est transcrit à partir du gène micro ARN par l'ARN polymérase II (Pol II).

Il est ensuite clivé dans le noyau en pré-micro ARN par un complexe enzymatique (Drosha et DGCR8) puis exporté dans le cytoplasme via le transporteur Exp5.

Il est alors à nouveau clivé par une enzyme spécifique appelée « Dicer » (complexée avec la protéine TRBP qui se lie au pré-microARN) pour devenir le microARN définitif (20 à 25 nucléotides).

La figure 6 illustre la synthèse des microARN.

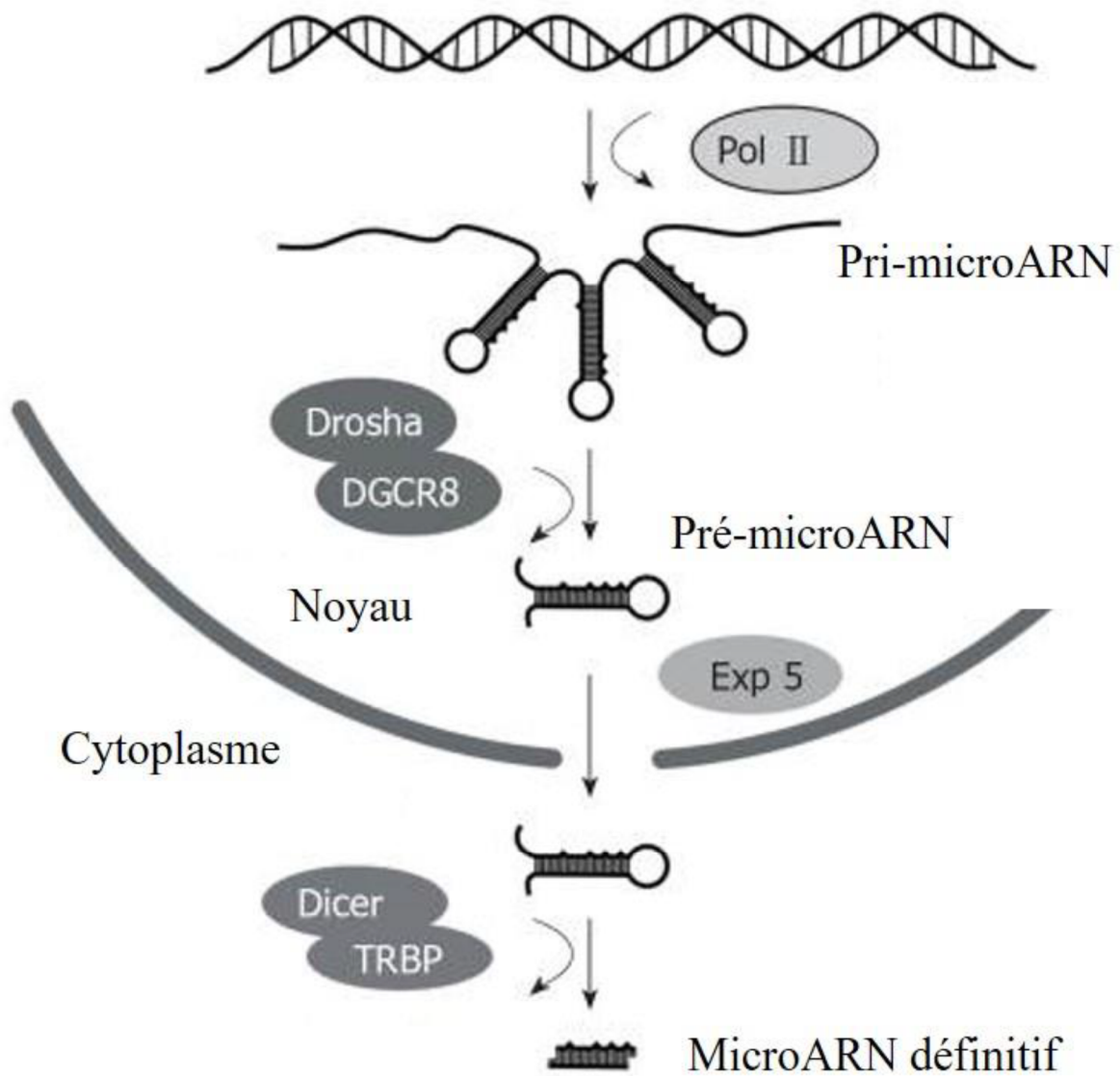


Figure 6: Schéma de la synthèse des microARN d'après ARBUTHNOT et THOMPSON (2008) (17)

Les microARN peuvent interagir avec différents ARNm : une complémentarité parfaite conduit au clivage de l'ARNm (via la formation d'un RISC ou complexe d'extinction induit par l'ARN), une complémentarité partielle (2 à 8 nucléotides) conduit à une absence de traduction sans dégradation complète de l'ARNm.

Dans un objectif de modification de l'expression des gènes, deux types d'ARN régulateurs ont été créés :

- Les siARN pour « short interfering ARN » qui sont des ARN double brin artificiels qui ne peuvent pas être transcrits à partir d'ADN. Ils correspondent à un microARN définitif. La figure 7 montre le fonctionnement des siARN.
- Les short-hairspin ARN (en épingle à cheveux) transcrits à partir d'un plasmide ou par un virus recombinant. Ils correspondent à un pré-microARN.

Les siARN et les shARN sont parfaitement complémentaires des ARNm cibles et provoquent donc toujours la dégradation de leur cible – (18).

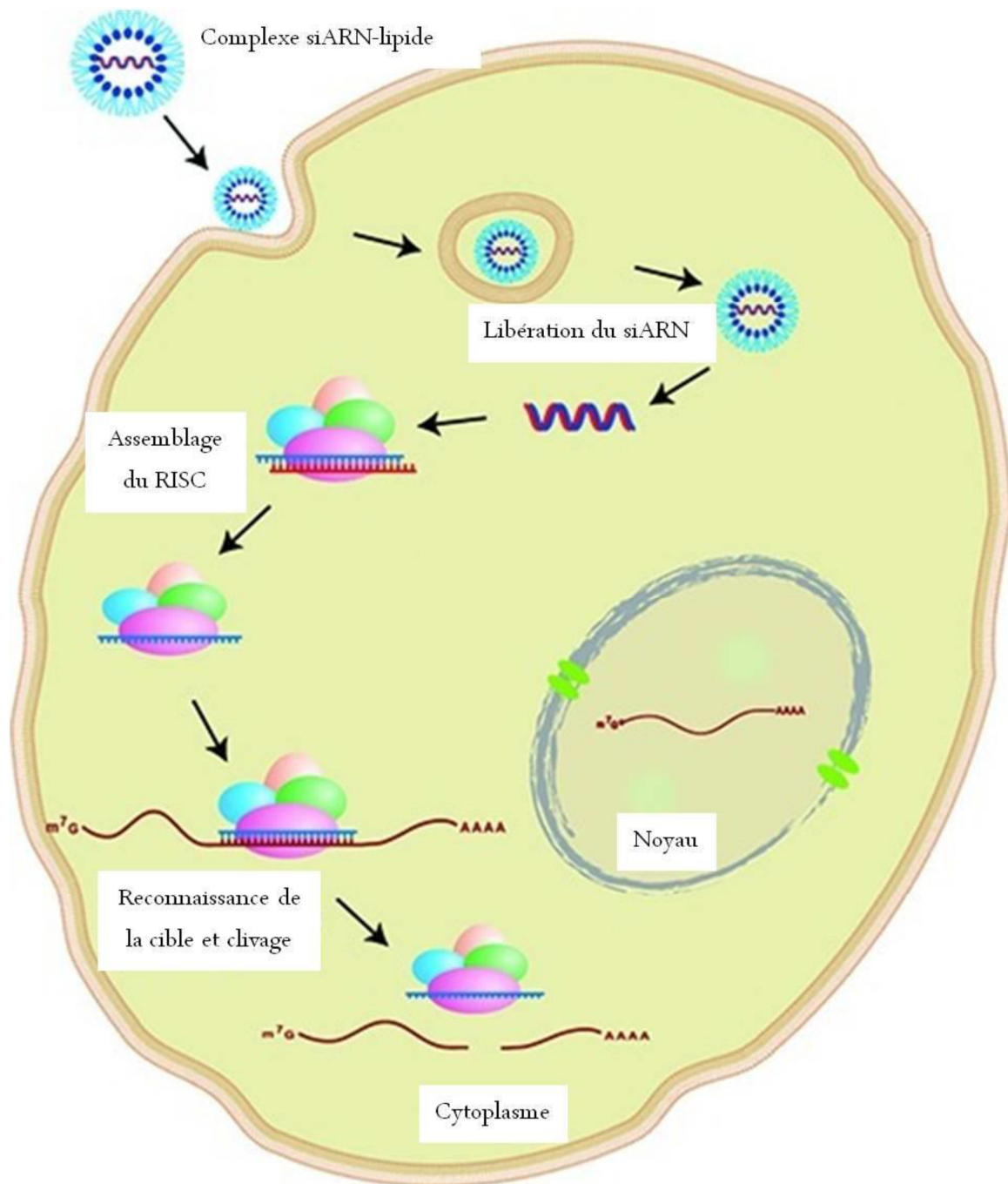


Figure 7: Mécanisme d'action des siARN, d'après LI Z. et RANA (2011) (19)

Les microARN sont utilisés dans la thérapie génique anti-cancéreuse principalement, mais aussi comme immunosuppresseurs.

Brown et son équipe (20) ont démontré qu'il était possible d'assurer l'expression d'un transgène à long terme en détournant le système des microARN.

A cette fin, ils ont inséré une séquence complémentaire d'un microARN endogène appelé miR-142-3p, spécifique des cellules hématopoïétiques, dans une cassette génique, transportée par un lentivirus. Ils ont remarqué que le transgène ainsi créé s'exprimait significativement plus longtemps. La figure 8 schématise l'expérience réalisée par Brown et son équipe.

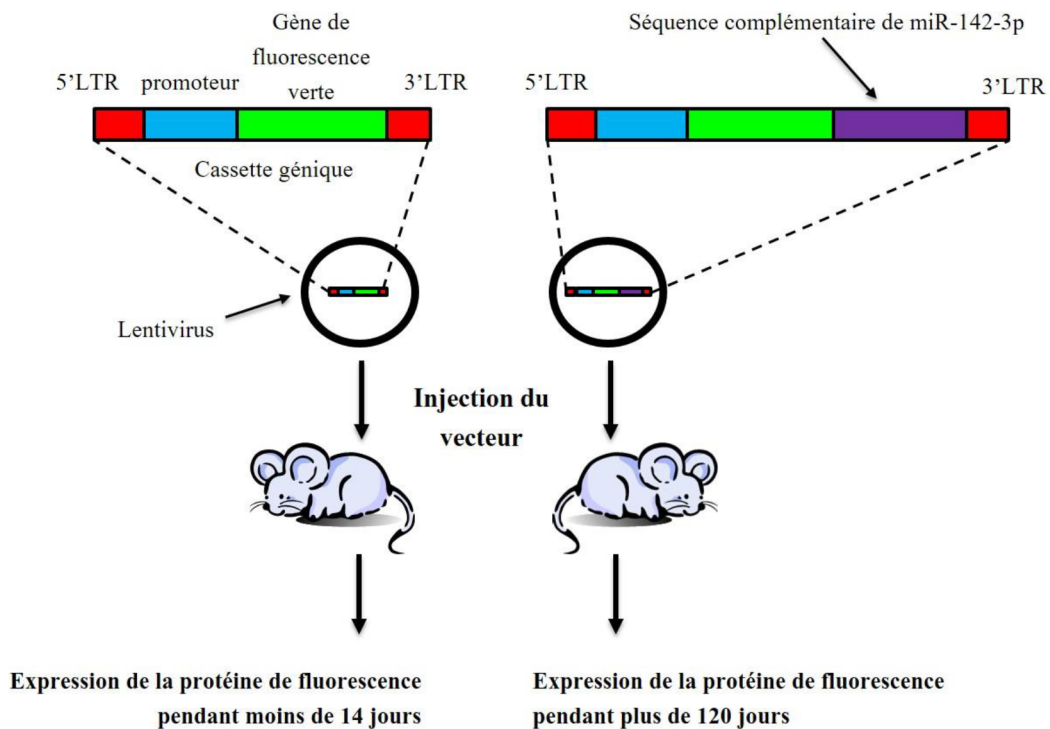


Figure 8: Schématisation de l'expérience menée par Brown et son équipe (20)

La différence de durée d'expression est supposée être due à la clairance immunitaire. En effet, lors de l'administration d'un vecteur, une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur et le produit du transgène se met en place et provoque l'extinction de l'expression du transgène. Une des origines de cette réponse immunitaire est l'infection des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par le vecteur malgré la présence de promoteurs tissu-spécifiques dans la cassette génique.

Or, dans cette expérience, une séquence complémentaire du miR-142-3p a été insérée dans la cassette génique : de ce fait, ils ont supposé que la présence de cette séquence provoquait la dégradation du transgène dans les cellules hématopoïétiques dont font partie les CPA.

Ainsi, le produit du transgène peut échapper à la réponse immunitaire. Brown et son équipe ont reproduit l'expérience et ont obtenu une expression à long terme du facteur IX chez des souris atteintes d'hémophilie B.

b. ARN anti-sens

Via un oligodésoxynucléotide qui se fixe sur une partie accessible d'un ARNm par complémentarité, il est en théorie possible d'empêcher la traduction de cet ARNm soit par blocage mécanique des ribosomes soit par recrutement d'une RNase – SULLIVAN et al. (2011) (21).

Cette méthode est cependant peu spécifique et n'a pas un taux de réussite très élevé car trop hasardeuse.

c. Ribozymes et ADNzymes (ou désoxyribozymes)

Ce sont des acides nucléiques capables de cliver de façon spécifique l'ARN. Ils se lient par complémentarité à un ARNm et le clivent en un site spécifique, empêchant ainsi la traduction. Il est possible de les encoder et de les transcrire à partir d'ADN – BARAR et OMIDI (2012) (22).

d. Autres molécules régulatrices

De nouveaux outils pour moduler l'expression génique ont été créés, la plupart à base d'ARN comme les « **ARN switches** ». Ce sont des molécules d'ARN formées d'un domaine sensitif capable de reconnaître certains signaux cellulaires (présence de certaines molécules de certaines séquences génétiques voire d'une modification d'un paramètre physique comme la température ou le pH intracellulaire) et d'un domaine acteur, capable de moduler l'expression génique – (18).

Il existe aussi un autre domaine de recherche pour les outils de modulation de l'expression génique : les molécules d'ADN formées par des liaisons de type Hoogsteen.

La plupart des liaisons entre les bases azotées sont des liaisons hydrogènes de type WatsonCrick (cf. Figure 9, A).

Or, il existe un autre type de liaisons hydrogènes appelées liaisons de type Hoogsteen (cf. Figure 9, B). Ces liaisons permettent de former différentes sortes de structures tridimensionnelles de l'ADN, autres que la double hélice.

Il a été prouvé que les G quadruplexes (structures formées par quatre brins d'ADN au sein des régions riches en guanine, capables de se lier par des liaisons

de type Hoogsteen à d'autres molécules d'ADN) interviennent dans la régulation de certains oncogènes – LIN et al. (2013) (23).

Les triplexes (une double hélice d'ADN liée à un troisième brin d'ADN ou d'ARN par des liaisons de type Hoogsteen) sont aussi impliqués dans certains mécanismes endogènes d'extinction génique – GHOSAL et al. (2006) (24).

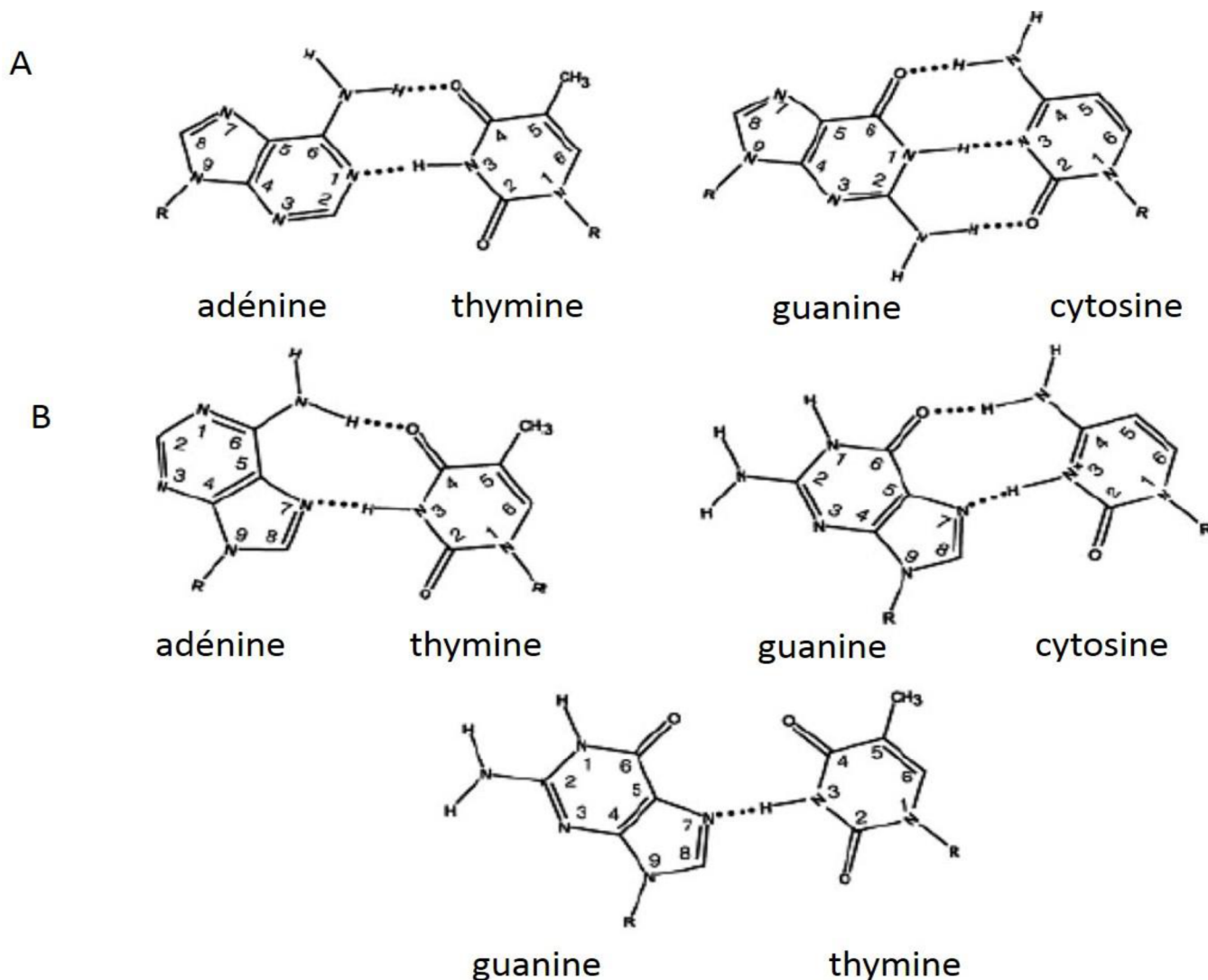


Figure 9: A. Liaisons Watson-Crick, B. Liaisons Hoogsteen, d'après GHOSAL et al. (2006) (24)

Suite à ces études, des molécules utilisant les liaisons de type Hoogsteen ont été développées comme les « polypurine reverse Hoogsteen hairpins ». Ce sont des molécules d'ADN formées par deux chaînes de purines antiparallèles reliées par une boucle de cinq thymidines. Les liaisons à l'intérieur des chaînes sont des liaisons de type Hoogsteen inversées.

Ces molécules sont capables d'interférer avec les gènes et d'en modifier l'expression par liaison avec le gène cible ou l'ARNm. Ce qui diminuera l'expression du gène cible – RODRIGUEZ et al. (2013) (25).

2. Expression forcée

L'expression forcée est le fait de provoquer l'expression de certains gènes d'un individu en insérant des promoteurs. On prendra ici l'exemple des thalassémies β .

Les thalassémies β sont des anémies héréditaires dues à une production réduite ou absente de chaînes β -globines qui composent l'hémoglobine (formule $\alpha_2\beta_2$). De ce fait, les chaînes α -globines sont en surnombre et ne peuvent pas toutes se lier à des chaînes β ; elles précipitent sous forme d'homotétramères α_4 et empêchent la maturation des précurseurs des hématies, ce qui conduit à leur apoptose et donc à une anémie.

Le phénotype des malades dépend de leur génotype (homozygotes ou hétérozygotes pour une mutation du gène codant pour la chaîne β) mais aussi de leur capacité à produire des chaînes γ -globines, présentes lors de la vie fœtale. En effet, les chaînes γ sont capables de se lier aux chaînes α libres et de former l'hémoglobine fœtale (formule : $\alpha_2\gamma_2$), et ainsi de diminuer la gravité des symptômes de la maladie.

Dans le traitement des thalassémies β par thérapie génique, une des pistes poursuivies est l'insertion d'une cassette génique comportant le gène de la γ -globine ainsi que son promoteur spécifique dans le génome des personnes malades. Cela provoquerait la production de cette globine par les cellules transduites et permettrait de réduire les symptômes de la maladie.

Les essais cliniques in vitro sont prometteurs – PAPANIKOLAOU et al. (2012) (26).

3. Autres modifications

On remarque que, pour chaque maladie, les techniques développées précédemment sont adaptées afin de traiter la maladie avec la meilleure efficacité. Ainsi, la recherche sur ces maladies conduit régulièrement à la création de nouvelles techniques de thérapie génique comme l'épissage de gène dans la myopathie de Duchenne

III. Modalités d'administration de la thérapie génique

A. In vivo

L'administration in vivo consiste à injecter le vecteur par voies intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire directement chez l'hôte. Le principal problème est alors le contrôle de l'adressage de la séquence d'ADN d'intérêt uniquement dans les cellules cibles.

Cette voie permettrait néanmoins l'utilisation de la thérapie génique à grande échelle et à moindre coût. Les études sur les vecteurs cherchent donc à les rendre utilisables et efficaces en thérapie in vivo.

On peut également injecter le vecteur directement dans le tissu cible. On appelle cette administration in situ. Cependant, le taux de transfection reste

faible car le vecteur diffuse peu, ce qui est le plus souvent incompatible avec une guérison complète, sauf dans le cas de tumeur localisée – NAYEROSSADAT et al. (2012) (27).

B. Ciblage de l'expression du transgène

Lors d'administrations in vivo, il est nécessaire de faire pénétrer le gène d'intérêt uniquement dans les cellules cibles et donc de pouvoir cibler l'utilisation de la thérapie génique.

Le ciblage peut être réalisé à plusieurs niveaux :

–**Au niveau de la séquence d'ADN** : Il est possible d'associer un promoteur tissu spécifique au transgène. Malheureusement, peu de promoteurs spécifiques d'un seul tissu sont connus et l'expression, qui suit l'utilisation d'un tel vecteur, est souvent limitée en quantité, parfois trop faible pour avoir un effet thérapeutique.

–**Au niveau des vecteurs** : Certains vecteurs, comme les virus, ont un tropisme naturel mais il est souvent très large. La plupart des vecteurs sont modifiables afin de leur faire porter des protéines de surface ciblant spécifiquement un tissu (ou pseudotypage, cf. ultérieurement).

–Il est aussi possible de moduler **à distance** l'expression d'un transgène en utilisant par exemple des promoteurs réagissant à la présence ou à l'absence d'une molécule.

On prendra comme exemple les systèmes « Tet Off » / « Tet On ». Les systèmes « Tet Off » / « Tet On » sont dérivés de l'opéron bactérien de résistance à la tétracycline. Des trans-activateurs (rtTA) sont produits de façon constitutive à partir de la fusion de la protéine tet-répresseur (tetR) et d'une protéine virale (VP16). Dans le système « Tet Off » (Figure 10, a), en absence de doxycycline (Dox), les trans-activateurs se lient à la séquence tetopératrice (TetO) et provoquent l'activation du promoteur du cytomégalovirus (CMV) ainsi que l'expression du transgène. La doxycycline se lie aux trans-activateurs, les empêchant ainsi d'activer TetO. Le système « Tet On » fonctionne à l'inverse (Figure 10, b) – NAIDOO et YOUNG (2012) (28).

Le système « Tet Off » (expression en absence d'antibiotiques) est particulièrement intéressant pour la thérapie génique alors qu'en transgénèse animale, c'est surtout le système « Tet On » (expression en présence d'antibiotiques) qui est utilisé.

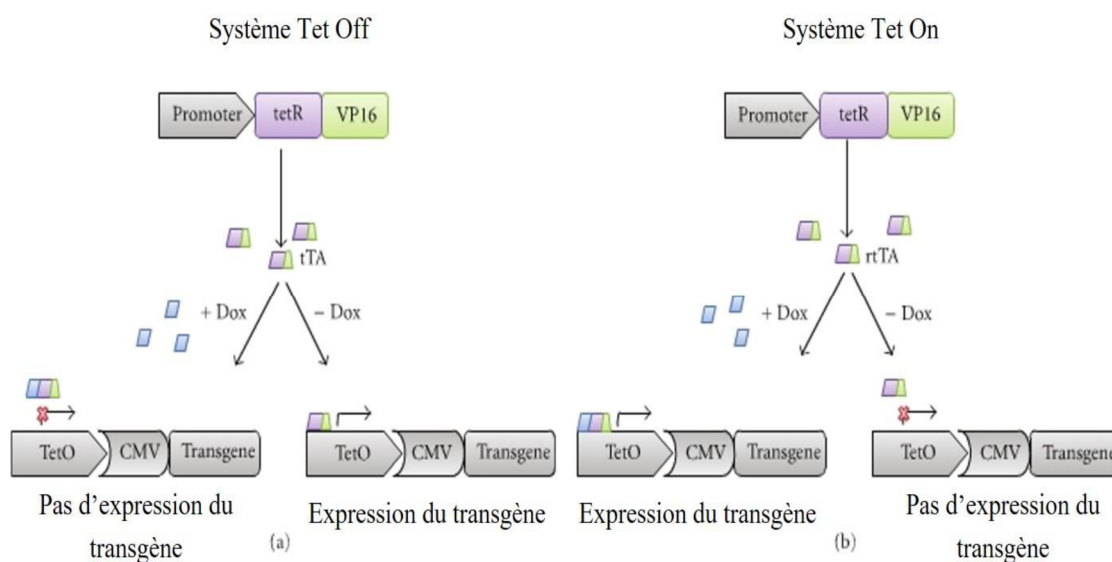


Figure 10: Mécanismes des systèmes « Tet Off » / « Tet On » d'après NAIDOO et YOUNG (2012) (28)

On ne développera pas plus ici les techniques de ciblage car elles sont spécifiques à chaque couple maladie/vecteur.

C. Ex vivo

L'administration ex vivo se déroule en trois étapes :

- Prélèvement des cellules de l'hôte (selon la maladie, des cellules sanguines ou de leurs précurseurs, qui seront réinjectées dans la circulation ou des fibroblastes qui seront greffés comme un néo-organe),
- Transfection en culture in vitro des cellules prélevées,
- Réinjection ou greffe chez le sujet des cellules transfectées.

Cette administration permet de cibler la thérapie génique uniquement vers les cellules ou le tissu à corriger et d'éviter ainsi des foyers ectopiques d'expression du transgène.

Elle empêche aussi toute réaction immunitaire au vecteur puisqu'il n'est pas en contact direct avec l'organisme – NAYEROSSADAT et al. (2012) (27).

La figure 11 présente le concept de thérapie génique in vivo et ex vivo KAUFMANN et al. (2013) (29).

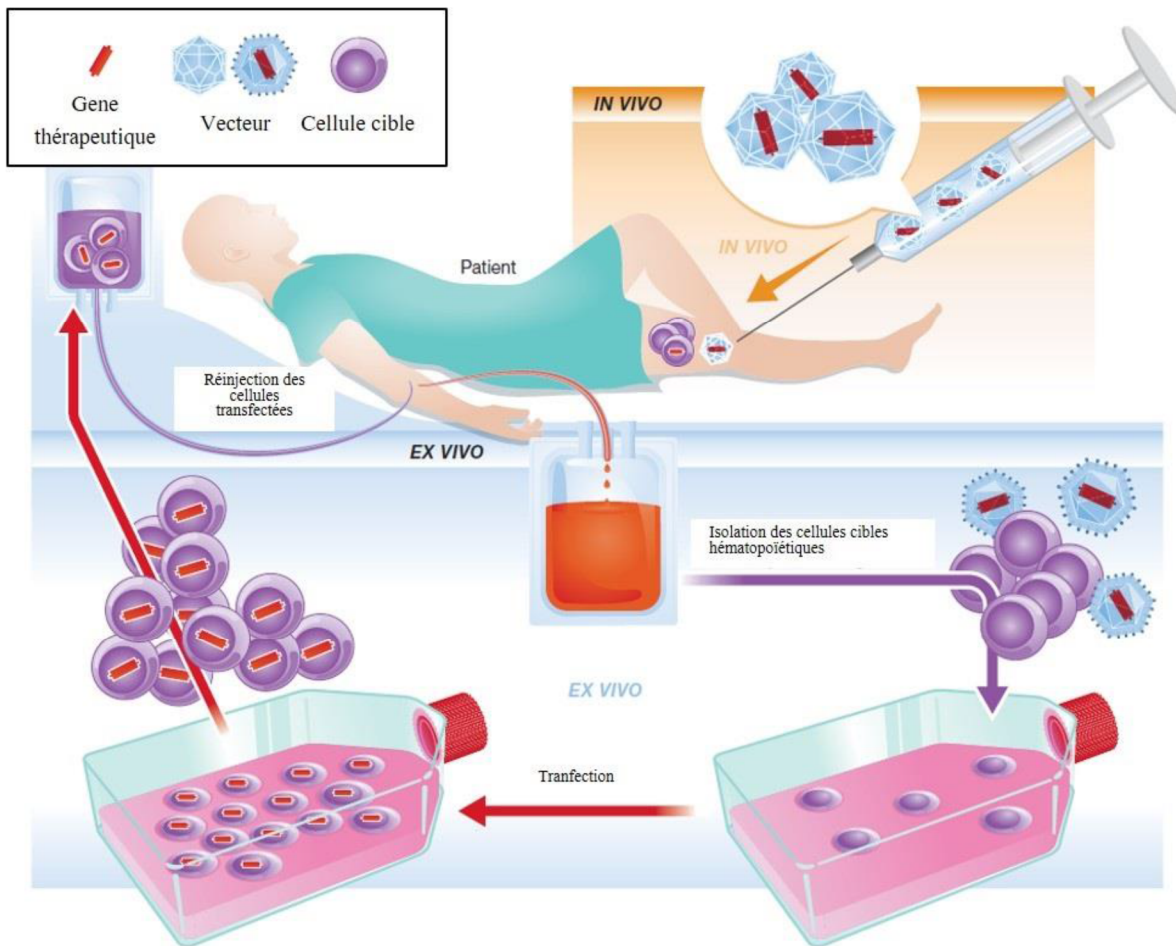


Figure 11: Concept de thérapie génique in vivo et ex vivo d'après KAUFMANN et al. (2013) (29)

IV. Les vecteurs

Un vecteur est une structure permettant le transport, la pénétration du transgène dans les cellules cibles, son expression et son action thérapeutique. Le vecteur idéal a plusieurs propriétés – PEREZ-LUZ et DIAZ-NIDO (2010) (5) – MANJILA et al. (2013) (30) :

- Culture/production facile et de faible coût
- Faible immunogénicité,
- Non cytotoxique ou pathogène,
- Possibilité d'insérer une séquence d'ADN relativement longue,
- Protection de la séquence insérée contre les nucléases,
- Capacité d'infection des cellules quiescentes comme en division,
- Ciblage des cellules à transfecter possible,
- Ciblage du site d'insertion ou insertion en un site non mutagène,
- Expression à long terme du transgène chez l'hôte.

A l'heure actuelle, on peut classer les vecteurs en deux types : les vecteurs viraux, les vecteurs non viraux.

A. Les vecteurs viraux

Les virus sont naturellement capables de pénétrer dans les cellules et d'y injecter leur propre génome afin de se répliquer.

En réussissant à supprimer les gènes responsables de la pathogénicité des virus sans modifier leurs capacités de pénétration, ces derniers sont devenus des vecteurs de choix pour le transport et la livraison des gènes en thérapie génique.

Le principal risque de l'utilisation de virus en tant que vecteurs est leur pathogénicité résiduelle pour l'hôte, malgré les délétions des gènes à effet pathogène, et le risque qu'ils le redeviennent par mutation. Enfin, le principal défaut des virus est leur immunogénicité – PEREZ-LUZ et DIEZ-NIDO (2010) (5).

De nombreux virus sont utilisés en thérapie génique (Adénovirus, Lentivirus, AdenoAssociated Virus ou AAV, Herpesvirus, ...) et chaque famille de virus a ses avantages et ses inconvénients.

Nous allons prendre ici quelques exemples de virus utilisés en thérapie génique.

1. Les Adénovirus

Les adénovirus sont des virus nus à ADN double brin. Leurs caractéristiques sont :

Taille des virions entre 80 et 120nm de diamètre, Capside icosaédrique, Génome linéaire et long de 26 à 44 kilobases (kb). Il existe plus de cent sérotypes découverts à ce jour dont 51 infectant l'Homme.

Les adénovirus figurent parmi les vecteurs les plus utilisés en thérapie génique et le sérotype 5 (HAd5) est le plus étudié – SHARMA et al. (2010) (31).

Les adénovirus s'attachent aux cellules via un récepteur appelé CAR (pour Coxsackievirus and Adenovirus Receptor). La protéine virale VI permet l'échappement de l'endosome. Les dynéines cytoplasmiques permettent le transport de la capsid le long des microtubules jusqu'aux pores nucléaires où la capsid est désassemblée via l'interaction avec différentes protéines pour libérer

le matériel génétique dans le noyau sous forme d'épisome d'après COUGHLAN et al (2010) (32).

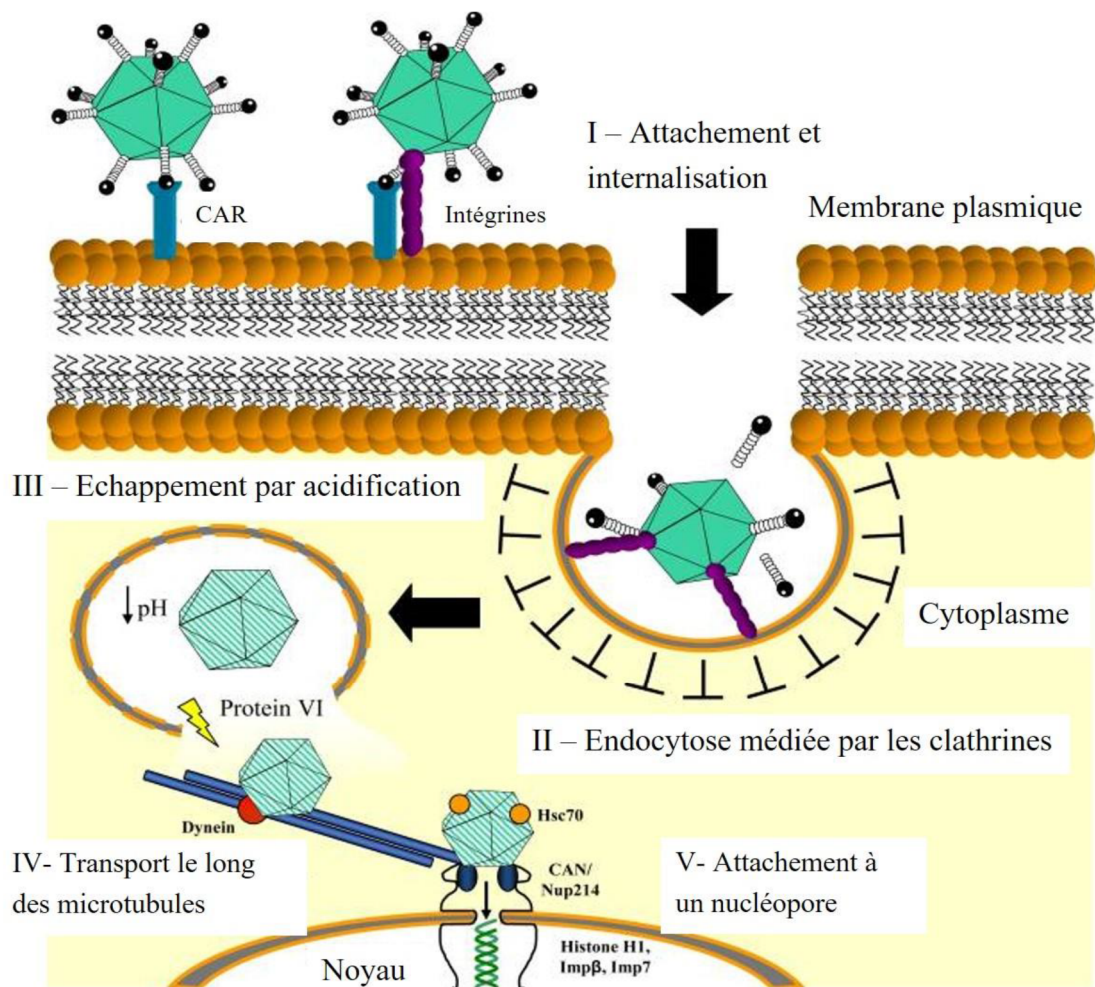


Figure 12: Mode de pénétration de l'adénovirus HAd5 d'après COUGHLAN et al. (2010) (32)

Les adénovirus sont capables d'infecter les cellules en division comme les cellules quiescentes, mais ils n'intègrent pas leur ADN dans le génome de la cellule cible.

Cela permet d'éviter les mutations par intégration, mais empêche une expression à long terme du transgène pour lequel on observe un pic d'expression en 1 à 7 jours puis un rapide déclin en 2 à 4 semaines post infection.

La première génération de vecteurs a montré une capacité à transfecter de nombreux tissus (muscles, cerveau, pancréas, rein, ...) lors d'une injection directe du vecteur dans le tissu cible alors que seulement le foie et la rate étaient transfectés lors d'injection intraveineuse. Cela a été imputé à la réaction immunitaire mise en place au contact du vecteur.

Les vecteurs de première génération étaient capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 8kb – NAYEROSSADAT et al. (2012) (27).

Des adénovirus vides ou « gutless » ont été créés afin de résoudre ce problème. Ils ne comportent plus d'ADN viral sauf les quelques séquences strictement nécessaires à la réplication du génome.

Ces adénovirus sont produits en présence de cellules transcomplémentantes ou cellules « helper » qui leur procurent les protéines virales nécessaires à la construction des virions – KAMIMURA et al. (2011) (33).

Ces virus sont capables de transporter des transgènes de plus grande taille (jusqu'à 38kb) et l'expression du transgène se fait à plus longue échéance (une étude a montré une expression pendant plus de 2 ans dans le foie de babouins) – LENTZ et al. (2012) (34).

De nombreuses études sont réalisées afin de moduler le tropisme des adénovirus via l'identification des récepteurs cellulaires et viraux impliqués dans la pénétration cellulaire et dans la réponse immunitaire. En particulier,

l'utilisation des adénovirus en thérapie génique anticancéreuse est compliquée par le fait que la plupart des cellules cancéreuses n'expriment pas le récepteur CAR – SHARMA et al. (2010) (31).

Ces recherches sont donc essentielles pour pouvoir utiliser les adénovirus comme vecteurs dans le traitement des maladies acquises.

2. Les Adeno-Associated virus

Les Adeno-Associated Virus (ou AAV) sont des virus incapables de se répliquer sans un virus « helper » tel que les adénovirus, les herpesvirus, ... Ce sont de petits virus (18-26 nm) nus à ADN simple brin. A l'état naturel, ils sont capables de s'intégrer dans le génome humain, préférentiellement dans un site spécifique sur le chromosome 19 grâce à des protéines virales codées par leur gène REP.

Le taux d'intégration spontanée est faible et quasiment nul quand le gène REP est supprimé. Dans ce cas, l'intégration perd aussi sa spécificité de site – LENTZ et al. (2012) (34) – LI H. et al. (2011) (35).

Leur matériel se comporte la plupart du temps comme un épisome et reste en dehors du génome de la cellule infectée.

Les vecteurs créés à partir d'AAV sont capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 4,8kb – NAYEROSSADAT et al. (2012) (27).

Il existe de nombreux sérotypes peu toxiques pour l'organisme et chaque sérotype cible préférentiellement différents organes (par exemple, le sérotype 2 infecte préférentiellement les cellules musculaires et les neurones) – KAMIMURA et al. (2011) (27).

Ils sont donc tout indiqués pour servir de vecteurs en thérapie génique des maladies affectant l'appareil musculaire ou le système nerveux. Le principal inconvénient est qu'il faut injecter une grande quantité de virus afin d'obtenir une réponse thérapeutique significative et que cela provoque chez l'hôte une forte réaction immunitaire – ZHONG et al. (2012) (36), d'autant plus précoce que ces virus sont très répandus dans la population humaine.

Une étude réalisée en 2010 par Sylvie BOUTIN et son équipe révèle que 60% de la population humaine possède des anticorps anti-AAV1 et antiAAV2 – BOUTIN et al. (2012) (37).

De nombreuses études sont en cours afin de trouver les sérotypes qui permettront une meilleure efficacité de transfection (en quantité) tout en limitant leur immunogénicité – SEN et al. (2013) (38).

3. Les Retroviridae

Les retroviridae sont une famille de virus enveloppés à ARN simple brin. Ils possèdent tous une reverse transcriptase qui permet de transcrire leur matériel génétique en ADN, une intégrase qui permet l'intégration du matériel génétique viral au génome de la cellule infectée et trois gènes principaux : pol, gag et env qui codent respectivement pour la reverse transcriptase et l'intégrase, les protéines de la capsid et les protéines de l'enveloppe. Ils mesurent 80 à 130 nm de diamètre et leur génome fait de 8 à 11 kb.

Les vecteurs fabriqués à partir de virus de la famille des retroviridae ne possèdent plus les gènes nécessaires à la réplication. Les vecteurs sont créés en présence de cellules possédant ces gènes (cellules transcomplémentantes), qui

leur fournissent ainsi les protéines virales nécessaires à la construction des virions.

Cependant, le signal d'encapsidation et les régions LTR (Long Terminal Repeat) qui bordent le génome de ces virus doivent être maintenus car elles interviennent dans plusieurs étapes importantes comme l'intégration et la régulation de la transcription du génome virale.

En les conservant, on assure ainsi la bonne intégration et l'expression du transgène transporté par le vecteur – KAMIMURA et al. (2011) (33).

On peut classer les rétrovirus en deux catégories : les simples (alpha rétrovirus, beta rétrovirus, gamma rétrovirus et epsilon rétrovirus) et les complexes (delta rétrovirus, lentivirus et spumavirus) selon la diversité des protéines codées par le génome viral.

En effet, les rétrovirus complexes sont capables de pénétrer dans le noyau cellulaire via un transport actif alors que les rétrovirus simples profitent de la mitose pour pénétrer le noyau – LENTZ et al. (2012) (34).

La figure 13 illustre le cycle de réplication des retroviridae.

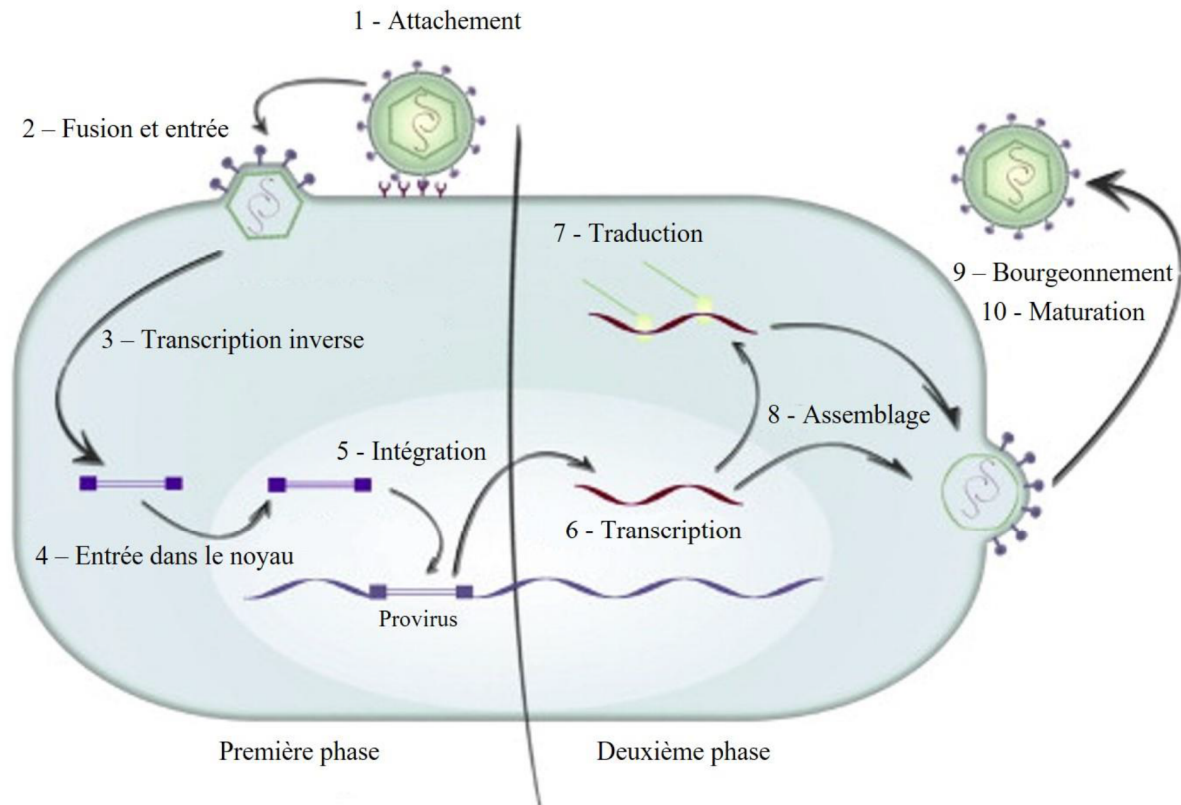


Figure 13: cycle de vie des rétrovirus d'après SPENCER et PALMARINI (2012) (39).

Dans le cas des virus enveloppés, et particulièrement dans le cas des retroviridae, on peut modifier le tropisme du vecteur viral en le pseudo typant.

Le pseudo typage est une technique qui consiste à modifier les glycoprotéines de surface des vecteurs viraux afin de modifier leur tropisme tissulaire.

Cette technique est dérivée de la modification des enveloppes des virus lorsque deux types de virus (ou plus) infectent la même cellule. Lors du bourgeonnement, les virions des deux types se retrouvent porteurs de ses propres glycoprotéines ainsi que de celles de l'autre type de virus.

On peut donc attribuer à un vecteur viral enveloppé la glycoprotéine que l'on souhaite pour pouvoir maîtriser son tropisme. A ce jour, les glycoprotéines les plus utilisées en pseudo typage sont les glycoprotéines du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G).

Ce virus possède un tropisme très large (presque tous les types cellulaires peuvent être infectés par un virus de la stomatite vésiculeuse) et une enveloppe très stable qui permet l'utilisation de l'ultracentrifugation pour concentrer le vecteur viral.

Il existe d'autres types de pseudo typage qui ne seront pas développés ici – CRONIN et al. (2005) (40).

a. Les rétrovirus simples

Les rétrovirus simples ont été très utilisés au début des essais cliniques en thérapie génique comme vecteur car ils permettent une intégration stable du transgène dans le génome de l'hôte. Ils ne peuvent cependant infecter que des cellules en division. Cela en fait des vecteurs tout indiqués dans les thérapies géniques ex vivo.

Plusieurs virus ont été utilisés avec succès comme vecteur en thérapie génique comme le virus de la leucémie murine de Moloney. Les vecteurs créés à partir de rétrovirus ont une capacité de 8kb - NAYEROSSADAT et al. (2012) (27).

Leurs inconvénients sont cependant majeurs : ils sont immunogènes (comme la majorité des vecteurs viraux) et peuvent provoquer le déclenchement de cancers par activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène répresseur de tumeurs lors de l'insertion du transgène dans le génome cellulaire.

Cela a été le cas lors de l'essai clinique conduit sur des enfants atteints du syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié à l'X (SCID X) en 2000.

Onze enfants ont reçu par thérapie génique ex vivo le gène codant pour la chaîne γ du récepteur aux interleukines et ont été guéris du SCID X. Malheureusement, plusieurs cas de leucémies ont été rapportés dans les trois ans qui ont suivi l'essai clinique.

Le déclenchement de la leucémie a été attribué à l'insertion du transgène au sein d'un proto-oncogène - ESCORS et BRECKPOT (2010) (1).

Les rétrovirus simples sont donc relégués au second plan jusqu'à ce qu'on sache maîtriser leur lieu d'insertion dans le génome hôte.

b. Les lentivirus Au sein des retroviridae

Les lentivirus (rétrovirus complexes) sont particulièrement étudiés en ce moment comme vecteurs en thérapie génique.

On utilise en thérapie génique des « self-inactivating » lentivirus (ou SIN lentivirus) dont le génome a été modifié afin de les rendre incapables de se répliquer.

Les lentivirus ont la capacité d'infecter des cellules quiescentes grâce à des protéines virales capables de faire pénétrer leur matériel génétique dans le noyau des cellules cibles via les pores nucléaires - KAMIMURA et al. (2011) (33).

Ce qui en fait des vecteurs de choix pour toutes les maladies impliquant des cellules hautement différenciées et qui se divisent peu, comme les neurones. Et comme tous les rétrovirus, ils sont capables d'insérer leur génome dans celui de la cellule hôte ce qui permet une expression à long terme du transgène.

Cependant, cette insertion dans le génome des cellules hôtes a déjà eu pour résultat de provoquer des mutations chez les cellules cibles. Néanmoins, les lentivirus seraient moins susceptibles de provoquer ces mutations par insertion - ESCORS et BRECKPOT (2010) (1).

En effet, ils insèrent naturellement leur matériel génétique près des sites de transcription actifs alors que les autres rétrovirus ont plutôt tendance à s'intégrer près des promoteurs, ce qui augmente le risque d'oncogenèse – KAMIMURA et al. (2011) (33).

Il est aussi possible d'utiliser des lentivirus qui ne peuvent pas intégrer leur matériel génétique : ce sont les « Non Integrating LentiViruses » (NILVs).

Dans ce cas-là, le transgène reste sous forme d'épisome dans le noyau cellulaire et l'expression à long terme du transgène est liée à l'état de quiescence des cellules infectées - LENTZ et al. (2012) (34).

Tout comme les rétrovirus simples, les vecteurs construits à partir de lentivirus ont une capacité de 8kb – NAYEROSSADAT et al. (2012). Malheureusement, les lentivirus induisent une forte réponse immunitaire de l'hôte à l'encontre du transgène ce qui diminue la durée de vie des cellules corrigées et donc l'effet thérapeutique.

Une des pistes d'étude serait l'utilisation de microARN pour induire une immunotolérance en empêchant l'expression du transgène dans les cellules présentatrices d'antigènes – DUFAIT et al. (2012) (41).

B. Les vecteurs non-viraux

Les vecteurs non-viraux correspondent à une autre catégorie de vecteurs qui ont été développés pour répondre au besoin de disposer de vecteurs non pathogènes à la différence des virus. Leur production est souvent plus facile et moins coûteuse, mais les taux de transfection restent inférieurs à ceux atteints lors de l'utilisation d'un vecteur viral.

Les vecteurs non viraux doivent lever de nombreuses barrières afin de pouvoir être utilisés *in vivo* (Figure 14). Ils doivent avoir une demi-vie assez longue dans le système circulatoire et aussi pouvoir traverser la membrane plasmique. D'autres vecteurs non viraux provoquent une endocytose. Il est alors nécessaire que le vecteur puisse se libérer de l'endosome. Une fois dans le cytoplasme, le vecteur non-viral doit libérer le transgène et/ou le guider jusqu'au noyau cellulaire.

Les mécanismes du fonctionnement de ces vecteurs ne sont pas encore tous élucidés (en particulier, le passage des acides nucléiques dans le noyau cellulaire après décomplexations) – GREEN (2012) (42).

Cependant, seule une très petite quantité des molécules d'acides nucléiques du vecteur arrive à destination dans le noyau d'une cellule cible viable. Le taux de transfection réussie avec expression du transgène est très faible par rapport à celui obtenu avec des vecteurs viraux, en particulier lorsque les cellules cibles ne sont pas en division.

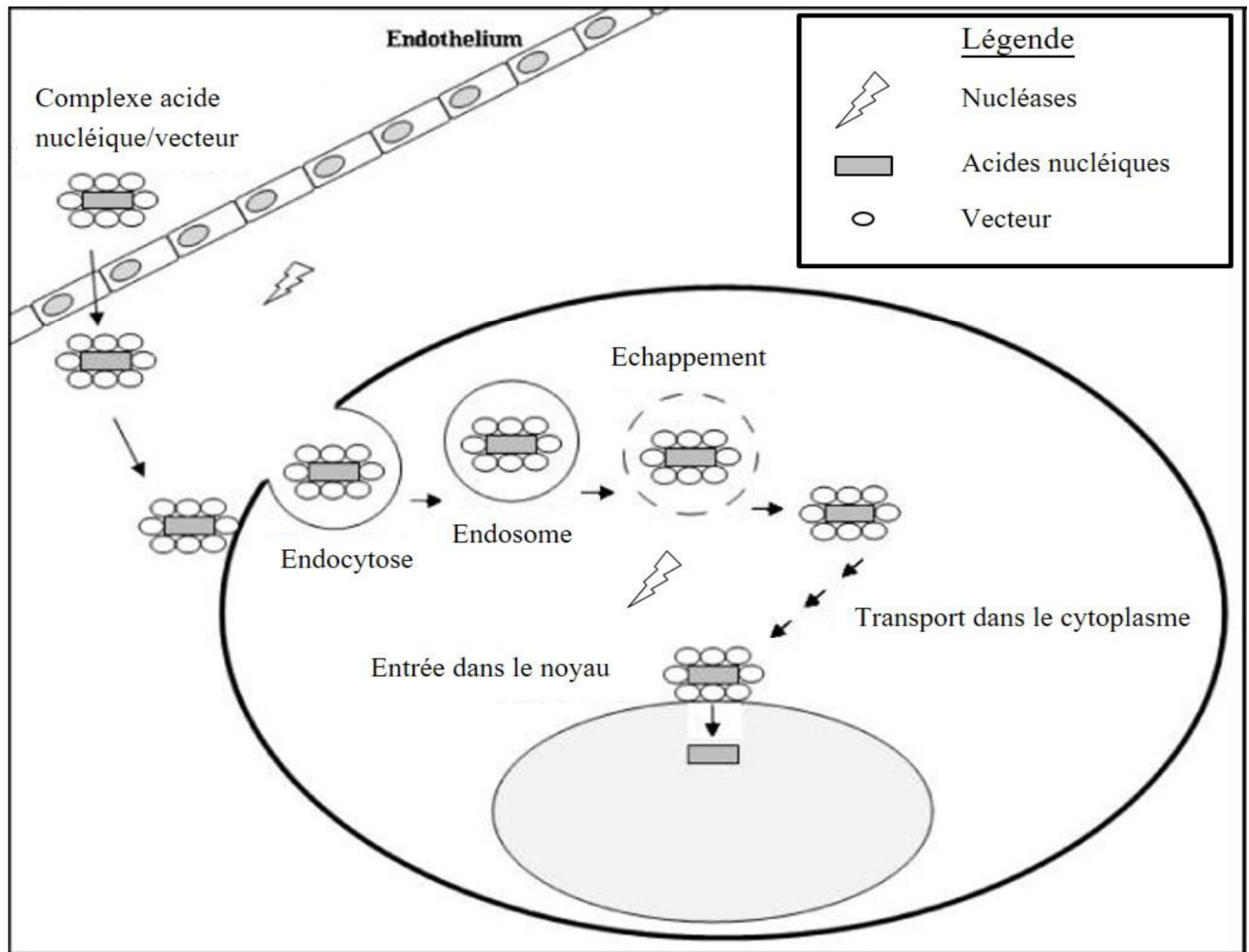


Figure 14: Représentation des barrières qui limitent l'utilisation de vecteurs non viraux in vivo d'après AL-DOSARI et GAO (2009) (43)

A la différence des virus, la plupart des vecteurs non-viraux ne sont pas naturellement spécifiques d'un type cellulaire et cela reste le plus grand défi à relever pour cette famille de vecteurs si on veut pouvoir l'utiliser in vivo.

1. Les vecteurs chimiques

a. Les lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des lipides formés par une chaîne hydrophobe et une tête hydrophile chargée positivement. Ce type de lipides s'est révélé être le plus efficace dans la fabrication de vecteurs en thérapie génique.

Il est possible de former avec ces lipides des liposomes qui sont des bicouches lipidiques sous forme de micelles. L'ADN chargé négativement interagit avec les charges positives des lipides et crée spontanément des lipocomplexes ou lipoplexes.

A la différence de la production de vecteurs viraux, les lipides cationiques sont très peu coûteux à produire. Ils ne sont pas pathogènes et provoquent une faible réponse immunitaire. Ils sont capables de transporter de grande quantité d'ADN (voire des chromosomes entiers) et peuvent être modifiés afin de cibler des cellules spécifiques via des lipoprotéines ou des anticorps insérés dans la bicouche lipidique – KAMIMURA et al. (2011) (33) – KONG et al. (2012) (44).

Cependant, on observe une certaine cytotoxicité lors de fusion avec les membranes cellulaires (plasmique, endosomale ou lysosomale) due à la présence du groupement hydrophile chargé positivement, le plus souvent une amine tertiaire ou quaternaire.

A cause du mécanisme de clairance hépatique (demi-vie très courte des liposomes), on n'observe qu'un faible taux de transfection – SARKER et al. (2013) (45).

Lors d'injection systémique, les liposomes peuvent provoquer des réactions d'hypersensibilité. L'addition de certains composés chimiques (comme

le polyéthylène glycol) permet de réduire leur toxicité tout en les stabilisant – MIELE et al. (2012) (46).

Des liposomes sont actuellement fabriqués et vendus par différents laboratoires la Lipofectamine 2000 ® est un liposome commercialisé par le laboratoire Life Technologies, fréquemment utilisé comme gold standard lors d'études sur un nouveau vecteur non viral.

b. Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des assemblages de macromolécules (comme des hydrocarbures, des monosaccharides, ...) modifiés par différentes réactions chimiques afin de posséder les groupements chimiques nécessaires à leur fonction (ici, des groupements cationiques).

Ils forment des polyplexes quand ils sont associés à de l'ADN. Ils sont à la différence des lipides cationiques, totalement solubles dans l'eau et ont l'avantage de pouvoir condenser l'ADN en des particules de petite taille, ce qui semble permettre une transfection plus efficace – LV et al. (2006) (47).

Les polymères à base de chaînes hydrocarbonées hydrophobiques se sont montrés les plus aptes au transport d'acides nucléiques.

Les polymères sont des molécules faciles à modifier par l'ajout ou le retrait de différents groupements ce qui en fait un sujet d'étude très vaste.

Il est possible, comme avec les liposomes, de leur adjoindre des groupements permettant le ciblage tissulaire. Les groupements amine et arginine semblent être déterminants dans le mécanisme d'échappement aux endosomes même si le mécanisme reste encore obscur – GREEN (2012) (42) – LEE et al. (2012) (48).

Cependant, plus leur capacité à transfecter les cellules augmente (présence de groupes hydroxyle, le ratio charges positives/ADN, longueur des chaînes de carbone ...), plus leur toxicité est élevée. Des moyens pour diminuer cette cytotoxicité sont à l'étude comme l'utilisation de polyéthylène glycol pour entourer les nanoparticules – ZHANG et al. (2012) (36).

De nombreux polymères sont à l'étude, le polyéthylèneimine (PEI) et le polypropylèneimine étant les plus étudiés. Des travaux ayant pour objectif de les modifier pour diminuer leur toxicité et augmenter leur capacité de transfection sont en cours – MANJILA et al. (2013) (30).

D'autres études se concentrent sur les polymères à base de chaînes aliphatiques de carbonates (succession de groupes - O – C (O) – O) – XU et al. (2013) (49).

c. Les polymères biodégradables

Il est démontré que les polymères biodégradables (comme les poly-amidoamines) ont une plus faible cytotoxicité que les polymères et lipides cationiques. Afin de créer des polymères biodégradables, il faut créer des liaisons hydrolytiques ou bioréductibles au sein du polymère notamment par l'addition de groupement disulfide – LEE et al. (2012) (48).

Cela réduit jusqu'à cent fois la toxicité du polymère par rapport à un polymère classique comme le polyéthylèneimine. Il est également possible d'utiliser des macromolécules biocompatibles. Nous prendrons ici deux exemples bien étudiés.

• **Le chitosane** (dérivé de la chitine) est un polysaccharide très étudié car biodégradable, biocompatible et qui possède des charges positives. Cependant,

sans modification il reste peu performant comme vecteur. Mais associé à différents groupements, le chitosane devient un support très prometteur – MAO et al. (2010) (50).

• **La gélatine** (dérivée du collagène animal) est déjà très utilisée dans l'industrie pharmaceutique en raison de ses caractères biocompatible et biodégradable. Elle est approuvée par la FDA et est très peu chère à produire. Des études ont montré qu'il était possible de créer des nanoparticules de gélatine capables de transporter des acides nucléiques (par encapsulation, complexation avec des groupements de surface ou par attraction électrostatique). Des études in vitro et in vivo ont montré le potentiel de la gélatine comme vecteur non viral par rapport à l'ADN nu et la Lipofectamine®.

Cependant, la majorité de la gélatine produite vient de l'industrie animale ce qui rend ce produit susceptible de transmettre des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles. De la gélatine humaine recombinante est disponible sur le marché et considérée comme moins à risque.

Cette gélatine est plus homogène et semble mieux convenir à la préparation de nanoparticules. A l'heure actuelle, la gélatine est surtout étudiée pour le transport de médicaments de nature autre que les acides nucléiques – ELZOGHBY (2013) (51).

Une différence majeure apparaît dans le transport des acides nucléiques : les siARN et autres oligonucléotides bénéficient d'un relargage rapide dans le cytoplasme alors que l'ADN doit être protégé des nucléases cytoplasmiques le plus longtemps possible afin d'être efficacement transporté jusqu'au noyau. Ainsi, deux types de biodégradabilité sont à l'étude

Une rapide (grâce par exemple aux groupements disulfides qui permettent une libération de l'acide nucléique lors du passage du vecteur en milieu intracellulaire) et une plus progressive – GREEN (2012) (42).

d. Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont des structures cylindriques formées par des feuilles de graphite concentriques. Leurs dimensions sont de 1 nanomètre de diamètre et de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres de longueur. On les classe en deux catégories selon le nombre de couches de graphite (une ou plusieurs).

Afin de pouvoir remplir leur rôle de vecteur et principalement afin de pouvoir se lier aux acides nucléiques, les nanotubes de carbone doivent être modifiés en surface par différentes réactions chimiques – HUANG et al. (2013) (52).

De nombreuses études ont déjà été menées afin de déterminer la modification la plus efficace et la moins toxique (Figure 15). Différents groupements cationiques ont été utilisés : des polymères comme le PEI, des polymères dendritiques (cf. paragraphe suivant), des lipides cationiques et autres nanoparticules. Leurs mécanismes d'action précis sont toujours inconnus.

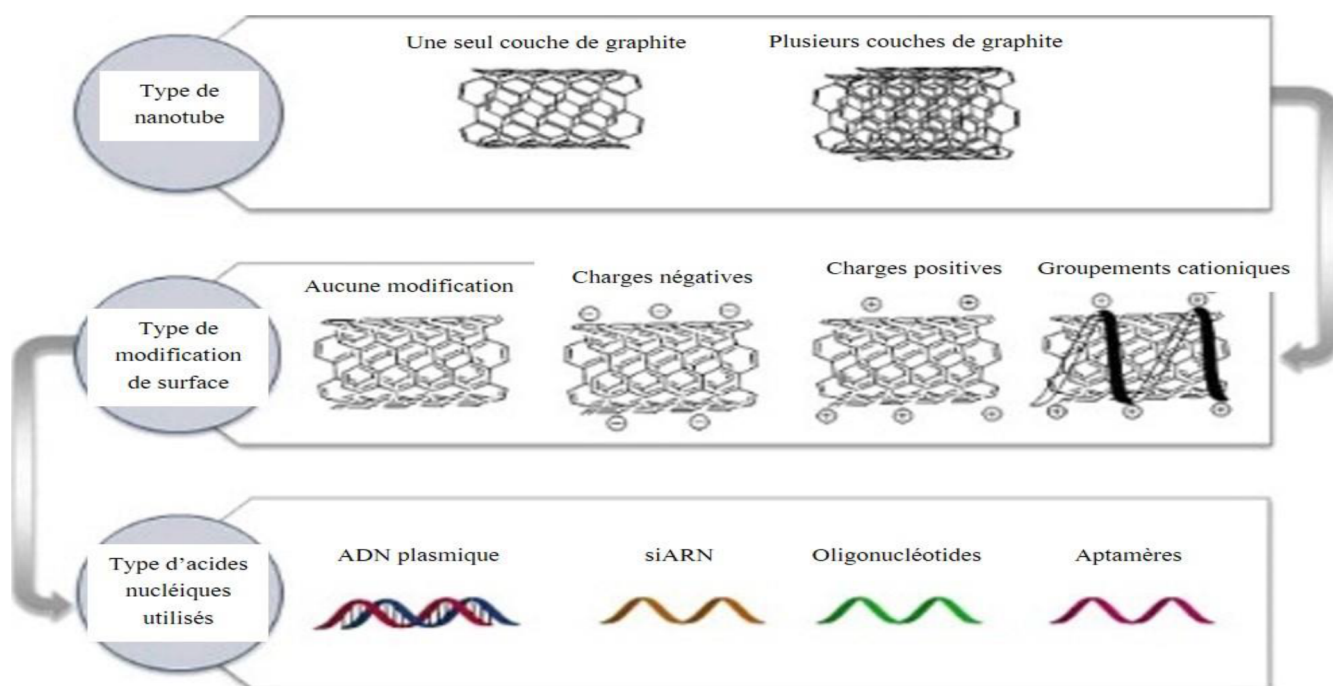


Figure 15: Combinaisons à base de nanotubes de carbone étudiées d'après BATES et KOSTARELOS (2013) (53)

L'efficacité des nanotubes de carbone a surtout été démontrée *in vitro* et d'autres études sur la toxicité doivent être réalisées avant que le nanotube modifié devienne le vecteur non viral de choix en thérapie génique – BATES et KOSTARELOS (2013) (53).

e. Autres nanoparticules non virales

De très nombreuses nanoparticules synthétiques ou naturelles sont à l'étude comme potentiel vecteur en thérapie génique, seuls quelques exemples intéressants seront développés ici.

Les polymères dendritiques (ou dendrimères) : Ce sont des macromolécules synthétiques, de l'ordre de grandeur du nanomètre, construites en trois dimensions. Il est possible d'y attacher un gène par liaison covalente ou par liaison électrostatique car ils possèdent de nombreux groupes hydrophobes,

hydrophiles, cationiques et anioniques qu'on peut modifier – MANDEVILLE et al. (2012).

Les dendrimères de polyamido-amines ou PANAM sont actuellement les dendrimères les plus prometteurs de par leur biocompatibilité et leur capacité à transférer les cellules – NAM et al. (2008) (54).

Les nanoparticules de phosphate de calcium : Le plus grand avantage de ces nanoparticules est qu'elles sont totalement biocompatibles et biodégradables car le phosphate de calcium est un élément présent chez les animaux et l'Homme sous forme d'os.

Des études in vitro ont montré la capacité des nanoparticules de phosphate de calcium à transporter des acides nucléiques et à transférer les cellules. Ces nanoparticules nécessitent une préparation spéciale afin d'éviter la précipitation ou l'agglomération et des modifications de surface pour les stabiliser in vivo – CAO X. et al. (2011) (55).

Les nanoparticules d'or : Ces nanoparticules ont la caractéristique de pouvoir relâcher les acides nucléiques qu'elles transportent quand elles sont soumises à une onde lumineuse (800 à 1200nm de longueur d'onde) ou une onde électrique. Elles sont aussi non toxiques et capables de protéger les acides nucléiques transportés contre les nucléases endogènes – PISSUWAN et al. (2011) (56).

Les nanoparticules à double couche hydroxyde : C'est une famille de cristaux dont la formule générale est $[M^{II} nM^{III}(OH)_{2+2n}] + (A^{m-})_{1/m} \times H_2O$ ($n = 2-4$) où M^{II} est un cation métallique divalent, M^{III} un cation métallique trivalent et A^{m-} un anion. Ces nanoparticules présentent une grande

biocompatibilité, une faible cytotoxicité et une capacité à relâcher leur chargement en fonction du pH.

Elles sont capables de lier des acides nucléiques par liaison électrostatique. Ces cristaux peuvent prendre différentes formes. Les formes hexagonales semblent rester dans le cytoplasme alors que les formes circulaires passent la membrane nucléaire. Leur stabilité reste à étudier afin de pouvoir les utiliser in vivo – LADEWIG et al. (2010) (57).

2. Les acides nucléiques nus

L'utilisation d'acides nucléiques dits nus (car non liés à une autre molécule) comme vecteur non viral en thérapie génique est pratiquée depuis plus de vingt ans.

L'ADN nu ne provoque pas de réponse immunitaire et est facile à produire via des systèmes bactériens et les techniques d'ADN recombinant. On crée alors des plasmides recombinants contenant une origine de réplication, un promoteur et la séquence d'intérêt.

Une des limites principales de l'utilisation des acides nucléiques nus est qu'ils ont une demi-vie très courte en raison de l'action des nucléases endogènes. L'autre limite est que l'expression du transgène est transitoire la plupart du temps.

Plusieurs hypothèses ont été formulées à ce sujet – YAN et al. (2012) (58) :

- Activation du système immunitaire contre le plasmide par des séquences d'ADN bactérien résiduelles (qui ne présentent pas de méthylation)
- Inactivation du promoteur s'il est viral. Les promoteurs viraux sont très utilisés (par exemple, la séquence LTR des rétrovirus) car il est démontré que

ces derniers provoquent une expression massive du transgène à la différence des promoteurs tissu spécifique – HERWEIJER et WOLFF (2003).

- Nombreuses mitoses induisant la perte du transgène non intégré Grâce à des méthodes physiques pour améliorer la transfection, le taux d'expression du transgène peut atteindre celui d'une transfection par vecteur viral – WOLFF et BUDKER (2005) (59).

a. Micro injection

Cette technique consiste à injecter directement les transgènes nus par le biais d'une solution d'acides nucléiques dans le cytoplasme ou le noyau des cellules grâce à des aiguilles de 0.5 à 5 μm de diamètre et un microscope optique spécialisé appelé micromanipulateur.

Cette technique est lourde à réaliser et se retrouve donc reléguée derrière les autres méthodes physiques. Elle est aujourd'hui surtout utilisée en transgénèse animale – MANJILA et al. (2013) (30).

b. Gene gun

La technique du « gene-gun » (ou pistolet à gènes) consiste à injecter dans les tissus cibles, à très grande vitesse, grâce à un gaz pressurisé, des microparticules d'or ou de tungstène (1 à 3 μm de diamètre) recouvertes d'acides nucléiques – NAYEROSSADAT et al. (2012) (27).

Cette méthode a été développée pour la création de plantes transgéniques dans les années 80. Cependant, il a été démontré que l'utilisation de cette méthode provoquait une réponse immunitaire plus importante que celle induite par la micro-injection d'ADN et ce, avec un apport d'une quantité d'acide nucléique moindre.

Actuellement, la technique du « gene-gun » est essentiellement utilisée dans la vaccination à partir de gènes ou vaccination ADN – MANJILA et al. (2013) (30).

c. Technique hydrodynamique

Cette technique consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse (les quantités dépendent du modèle animal choisi).

Cette technique a été initialement décrite en utilisant la veine de la queue comme voie intraveineuse. Le mécanisme est le suivant : l'injection rapide d'un bolus provoque une congestion du cœur ce qui fait refluer le sang et le bolus dans le système veineux (veine cave inférieure et veine porte principalement).

L'augmentation de la pression veineuse provoque une dilatation des fenestrations des capillaires sanguins irrigant le foie et perméabilise les membranes plasmiques permettant ainsi l'entrée des acides nucléiques. Tous les paramètres systémiques reviennent à la normale en quelques minutes et les membranes plasmiques sont restaurées en 48 à 72h.

Par cette technique, les hépatocytes sont les cellules qui présentent l'expression génétique du transgène la plus importante. Des cellules du cœur, des poumons, de la rate et des reins montrent aussi une expression, mais 10 000 fois inférieure aux hépatocytes.

Cette technique est aussi utilisable pour transfecter d'autres tissus comme des muscles en bloquant la circulation sanguine le temps de l'injection. On peut utiliser des plasmides d'ADN ou d'autres molécules (siARN, oligonucléotides etc...) Le taux de transfection est de 30% à 40%, ce qui est le taux le plus

important décrit en utilisant un vecteur non viral – BONAMASSA et al. (2011) (60).

d. Electroporation

L'électroporation consiste à appliquer un courant électrique à un tissu pour faciliter l'entrée des acides nucléiques dans les cellules en créant des pores membranaires.

Il a été démontré que les courtes impulsions (100 μ s) de haut voltage permettaient de perméabiliser les membranes plasmiques et que les longues impulsions (100ms) de bas voltage permettaient de guider l'ADN dans les cellules.

Le voltage dépend du type d'application (directe ou en transcutané), du modèle d'étude ainsi que du tissu (les hépatocytes semblent résister à un courant plus fort que les cellules musculaires), sachant qu'il doit rester assez faible afin de ne pas détruire les cellules transfectées.

Cette technique est principalement utilisée in vitro. L'utilisation in vivo se limite aux cellules cutanées – CUKJATI et al. (2007) (61).

e. Nucléofection

Dérivée de la recherche sur l'électroporation, cette technique est actuellement la méthode électrique la plus sûre. Par l'association d'impulsions électriques avec une solution spécifique pour le transport des acides nucléiques, cette technique transporte les acides nucléiques directement dans le noyau des cellules.

Elle a le grand avantage de permettre la transfection de cellules se divisant peu ou quiescentes et elle est très reproductible. Des kits de nucléofection sont

disponibles sur le marché pour une utilisation in vitro uniquement (Exemple : Nucleofector®) – GRESCH et al. (2004) (62).

f. Sonoporation

La sonoporation est le nom donné au mécanisme provoquant la formation de pores sur la membrane plasmique sous l'effet des ultrasons. L'utilisation de microbulles est désormais presque incontournable car elles permettent d'augmenter le taux de réussite de cette méthode.

Les microbulles sont des particules remplies de gaz délimitées par une couche protéique ou lipidique. Ces microbulles peuvent être utilisées comme vecteur et être modifiées afin de pouvoir transporter des acides nucléiques (par exemple, en incorporant des lipides cationiques) et de pouvoir cibler les cellules d'intérêt (par l'insertion d'anticorps).

Les microbulles réagissent de deux façons aux ultrasons. A basse fréquence, les microbulles oscillent (expansion/rétrécissement) de façon linéaire jusqu'à entrer en résonance et osciller de façon stable. On appelle cela la cavitation stable. A haute fréquence, les microbulles oscillent de plus en plus vite jusqu'à l'effondrement des microbulles à cause de l'inertie du liquide environnant. On appelle cela la cavitation inertielle.

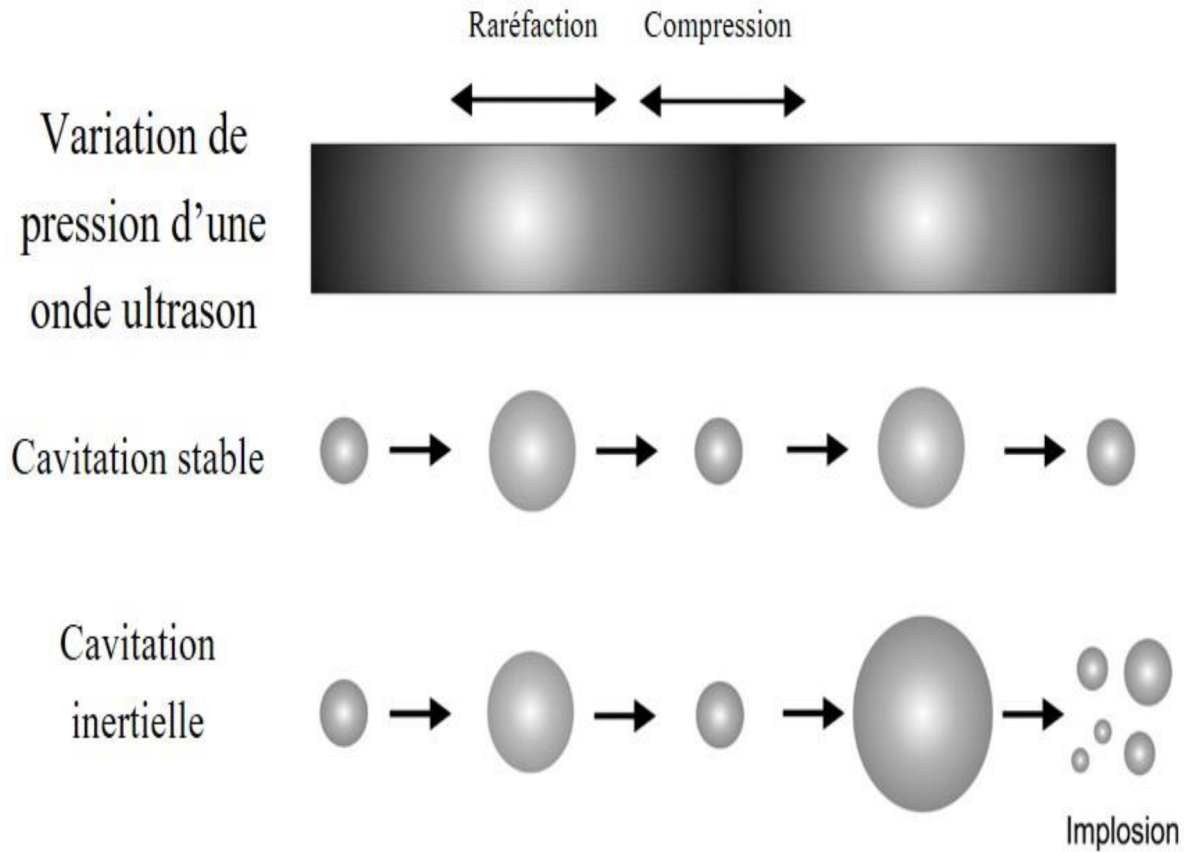
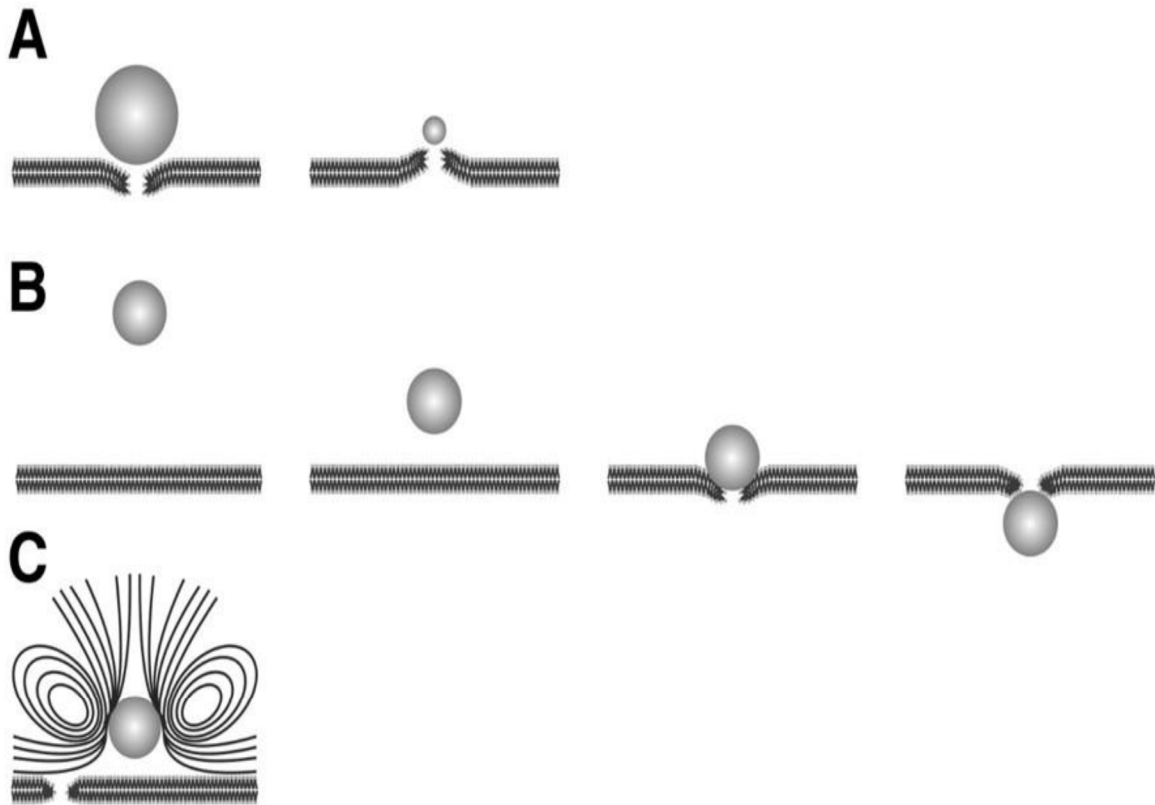


Figure 16: Schématisation de la réaction des microbulles aux ultrasons d'après LENTACKER et al. (2013) (63)

Les effets physiques sur la membrane plasmique des deux types de cavitation sont représentés sur les figures 17 et 18.



Légende

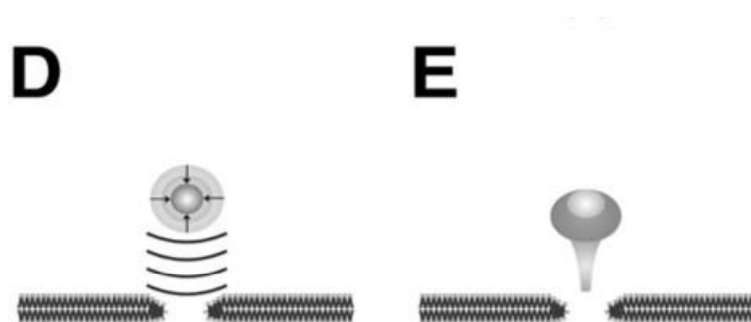
A : Formation d'un pore par poussée en phase d'expansion (à gauche) et succion en phase de rétrécissement (à droite)

B : Microbulle poussée à travers la membrane plasmique par les ultrasons

C : Formation d'un pore par la formation de micro-courants dans le fluide environnant par oscillation stable de la microbulle

Figure 17: Effets physiques de la cavitation stable d'après LENTACKER et al. (2013)

(63)



Légende

A : Formation d'un pore par les ondes de choc provoquées par l'effondrement de la microbulle

B : Micro-jet formant un pore lors de l'effondrement de la microbulle (asymétrique car proche d'une surface)

Figure 18: Effets physiques de la cavitation inertielle d'après LENTACKER et al. (2013)
(63)

Les deux types de cavitation provoquent aussi la formation de résidus super-oxydes qui modifient les canaux ioniques et entraînent la formation de pores par peroxydation des phospholipides membranaires.

De plus, il semble que les ultrasons augmentent le nombre d'endocytose /exocytose par modification de la concentration intracellulaire en calcium et par modification du cytosquelette – LENTACKER et al. (2013) (63).

La modification des microbulles est essentielle afin de perfectionner la sonoporation et d'en faire une méthode efficace de transfert d'acides nucléiques.

C. Perspectives d'améliorations

En parallèle de l'amélioration de la structure des vecteurs (viraux et non viraux), la recherche s'intéresse aussi à des méthodes permettant d'augmenter le taux de transfection et la stabilité de l'expression du transgène tout en diminuant la toxicité en faisant appel à différents systèmes.

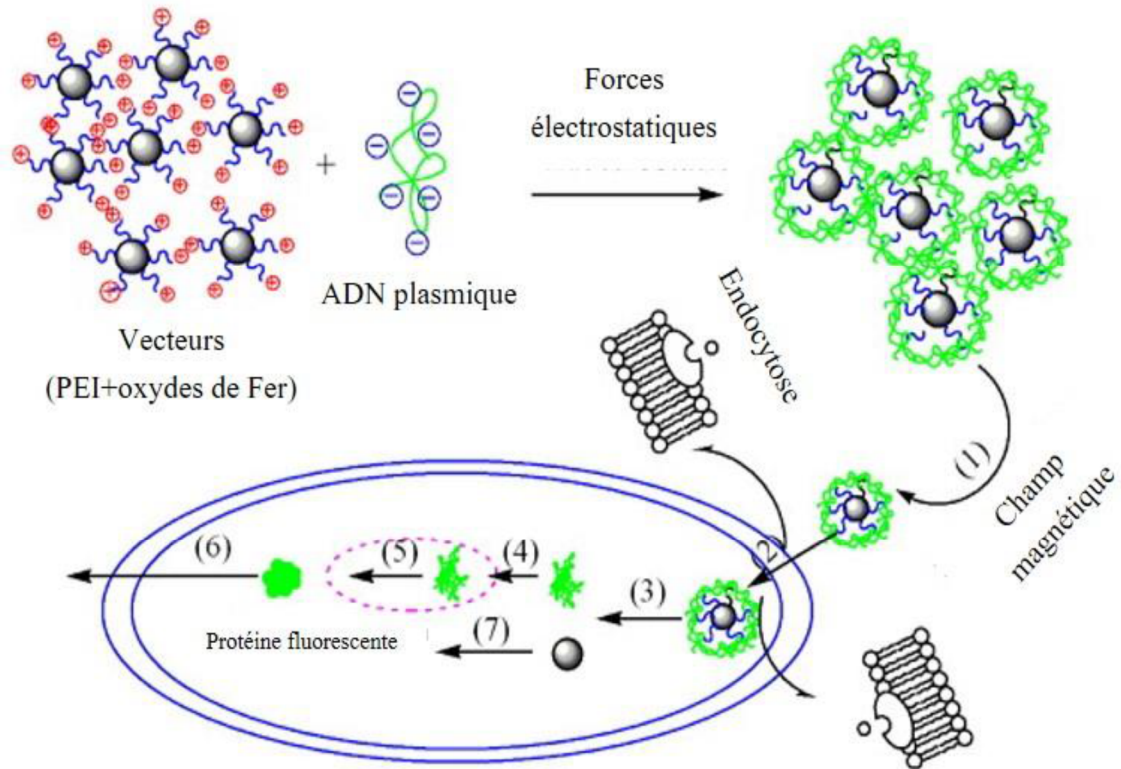
Voici quelques exemples de méthodes prometteuses. Il est à noter que ces molécules peuvent aussi être utilisées seules comme vecteur.

1. Les nanoparticules magnétiques

Il est possible d'attacher un vecteur (viral ou non) à une nanoparticule magnétique telle que la magnétite (Fe_3O_4) ou maghémite (Fe_2O_3) (sous forme de cristal de 5 à 20 nm).

Il est alors possible de guider le vecteur (et l'ADN qu'il transporte) injecté par voie intraveineuse ou intrapéritonéale par un aimant positionné au niveau du site ciblé et qui crée un champ magnétique localisé – LI C. et al. (2012) (64).

Zheng et al ont montré qu'il était possible de créer un vecteur stable à partir de PEI et d'oxyde de Fer magnétique et que ce vecteur pénétrait les cellules par voie d'endocytose (Figure 19).



Légende

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| (1) : Administration du vecteur | (5) : Expression |
| (2) : Endocytose | (6) : Traduction |
| (3) : Relargage intracellulaire | (7) : Expulsion de l'oxyde de Fer |
| (4) : Entrée dans le noyau | |

Figure 19: Schématisation du fonctionnement d'un vecteur magnétique codant pour l'expression d'une protéine fluorescente d'après ZHENG et al. (2012) (65)

Wang et son équipe ont prouvé que leur vecteur magnétique, fabriqué à partir de PEI, chitosane et de nanoparticules d'oxyde de Fer incluses dans des micelles, était non toxique pour les cellules transfectées, biocompatible et sûr en utilisation *in vivo* – WANG C. et al. (2012) (66).

Mannell et al ont démontré que l'utilisation de nanoparticules magnétiques en association avec la technique de sonoporation permettait de guider les microbulles vers le tissu cible et d'augmenter ainsi le taux de réussite de cette technique – MANNELL et al. (2012) (67).

L'utilisation d'un champ magnétique a aussi pour effet d'augmenter le taux de transfection par agrégation en un court laps de temps de très nombreux vecteurs autour des cellules cibles ce qui augmente la probabilité qu'un vecteur pénètre la cellule. Les mécanismes de pénétration ne semblent pas modifiés par le champ magnétique.

L'utilisation d'un champ pulsé par rapport à un champ statique augmenterait encore plus le taux de transfection. L'étude de l'utilisation d'un champ magnétique alternatif doit encore être approfondie – PLANK et al. (2011) (68).

Cette méthode, qui en est à ses débuts, serait une solution parfaite pour le ciblage des tissus à traiter lors d'utilisation de vecteurs non viraux ainsi que pour réduire la quantité de vecteurs nécessaires à une transfection efficace (de fortes doses de vecteurs provoquant le plus souvent une toxicité ou une réponse immunitaire) – LI C. et al. (2012) (64).

2. Les systèmes transposon/transposase Sleeping Beauty

Le système Sleeping Beauty est l'association d'un transposon (séquence d'ADN mobile) avec une transposase, enzyme qui catalyse l'excision et la réintégration du transposon. Ce système a été découvert chez la souris. La Figure 20 montre le fonctionnement du système transposon/transposase.

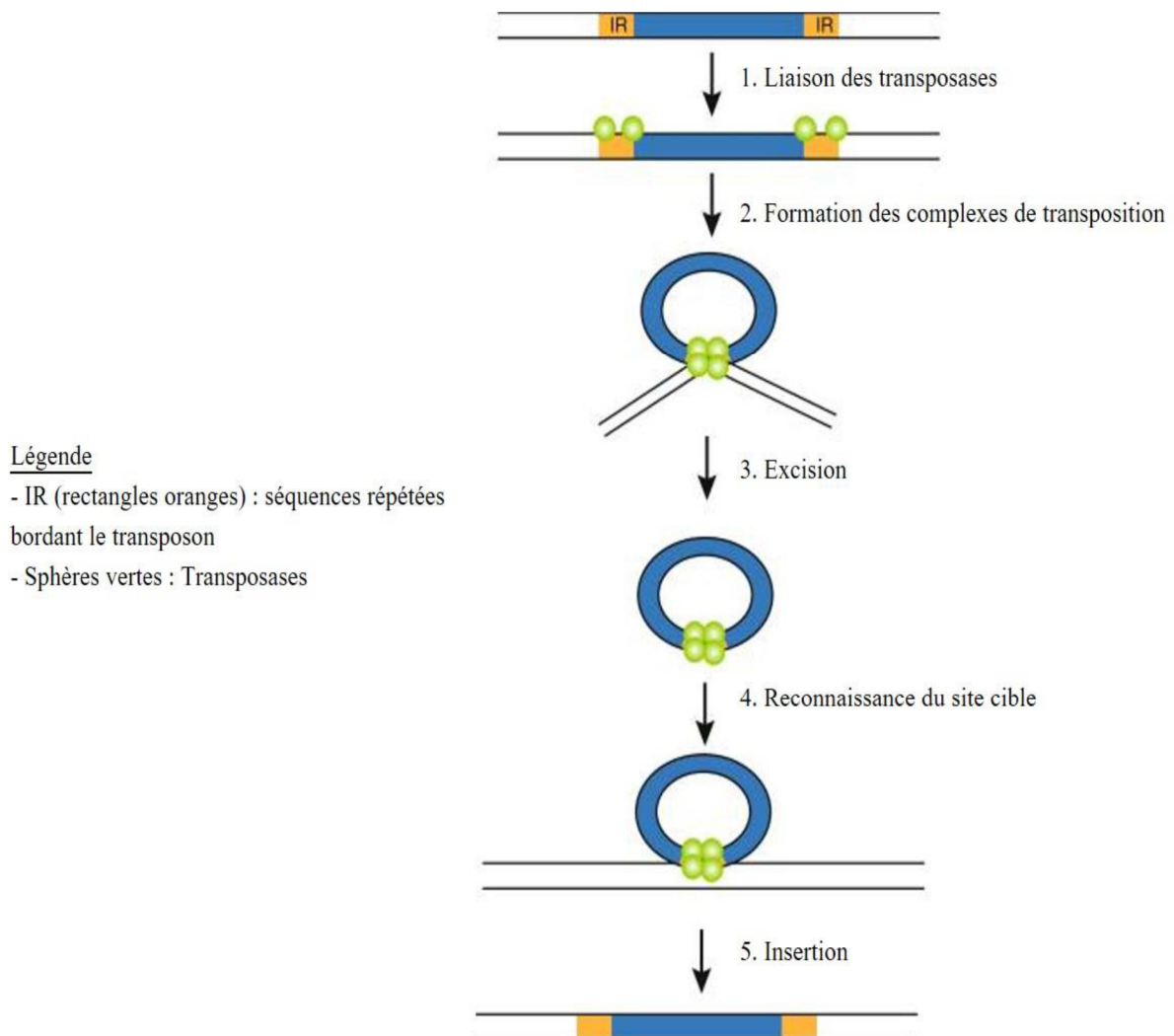


Figure 20: Schématisation du fonctionnement d'un système transposon /transposase d'après (Skipper, 2013) (69)

Associé à une séquence d'ADN sous la forme d'un plasmide, le système Sleeping Beauty est capable d'intégrer la séquence génétique d'intérêt dans le génome de la cellule transfectée – JUNG et al. (2013) (70).

Afin de parfaire ce système, de nouvelles transposases plus efficaces ont été développées. Le système amélioré s'appelle Sleeping Beauty hyperactif – FIELD et al. (2013) (71).

D'autres systèmes transposons/transposase (Tol2, PiggyBac) sont connus, mais semblent moins efficaces que le système Sleeping Beauty – PESSACH et NOTARANGELO (2011) (2).

L'avantage de ce système, par rapport aux vecteurs viraux et aux autres systèmes transposon/transposase est que son intégration semble être dirigée vers des lieux sûrs (« safeharbor »), loin des gènes transcrits et que son promoteur/enhancer est peu actif ce qui empêche la surexpression de gènes environnants.

3. Les aptamères

Les aptamères sont des séquences d'acides nucléiques, simple brin, de petite taille capables de se lier spécifiquement à des protéines ou à d'autres cibles cellulaires.

Leurs séquences sont conçues à partir de banques de séquences et sélectionnées par différentes méthodes de sélection comme SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) ou plus récemment Aptabid. Ils ont l'avantage de ne pas déclencher de réponse immunitaire, mais ont une demi-vie courte due à l'action des nucléases.

Il est possible de les modifier (modification des nucléotides en fin de séquence afin qu'ils ne soient pas reconnus par les endonucléases, utilisation de nucléotides modifiés dans la séquence comme les 2'-O pyrimidines modifiées) afin d'allonger leur demi-vie.

Les aptamères peuvent être utilisés comme vecteurs en thérapie génique grâce à leur grande spécificité et leur capacité à se lier à des protéines membranaires permettant leur internalisation. Cependant, ils ne peuvent transporter que des séquences nucléiques de petite taille (comme les siARN).

Les aptamères peuvent aussi être utilisés pour renforcer ou créer une spécificité de tissu : positionnés en surface d'un vecteur, ils peuvent agir comme le feraient des anticorps en ciblant une protéine de surface vis-à-vis de laquelle ils présentent une affinité.

Leur dernière utilisation consiste à les employer en tant qu'outil de thérapie génique car ils peuvent, en se liant, inhiber les fonctions de certaines protéines, telles que les facteurs angiogéniques – NI et al. (2011) (72).

Kotula et son équipe ont démontré in vitro que l'utilisation de chimères comprenant un aptamère et une protéine nucléolaire appelée la nucléoline, permettait une livraison efficace de la séquence nucléique d'intérêt directement dans le noyau cellulaire – KOTULA et al. (2012) (73).

*Chapitre II : L'application
de la thérapie génique
dans les génodermatoses*

I. Thérapie génique dans les épidermolyses bulleuses

L'épidermolyse bulleuse (EB) est une maladie génétiquement hétérogène de la peau avec une estimation de 500.000 cas partout dans le monde, elle est caractérisée par une fragilité chronique de l'épiderme avec formation de bulles principalement induites par des traumatismes minimes ou spontanés. (74) (75)

Les différentes formes d'EB sont causées par des mutations sur les gènes codants pour des composantes protéiques de la zone de jonction cutané.

Suite à ces mutations, les protéines de liaison produites sont soit fonctionnellement diminuées ou absentes. L'absence de la protéine ou de la réduction de son bon fonctionnement conduit à une diminution de la résistance de la peau au stress et aux forces mécaniques de cisaillement.

EB a été classée en quatre types principaux en fonction du niveau de la disjonction de la peau (voir la figure 21) :

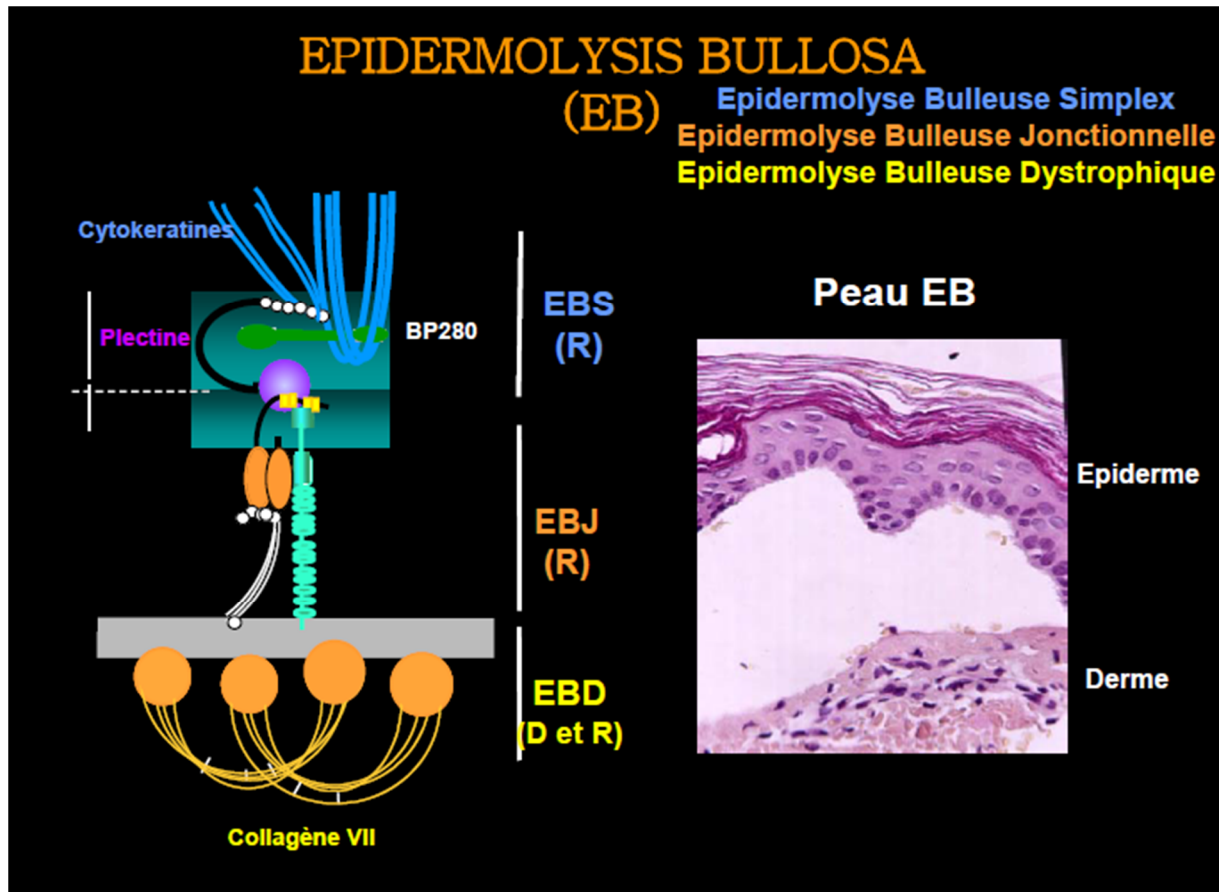


Figure 21: classification des epidermolyses bulleuses

- EB simplex (EBS) (figure 22)
- EB jonctionnelle (JEB) (figure 23 et 24)
- Dystrophique EB (DEB) (figure 25)
- Kindler Syndrome



Figure 22: Epidermolyse bulleuse simple forme koebener(her)



Figure 23: Epidermolyse bulleuse jonctionnelle forme herlitz (her).



Figure 24: Epidermolyse bulleuse jonctionnelle acrale (her)



Figure 25: les lésions cicatricielles avec grains de milium (her).

Actuellement, aucun traitement curatif général n'est disponible pour toutes les formes EB, bien que de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en développement comme la thérapie de remplacement protéique et les thérapies cellulaires fibroblastiques, ou encore la transplantation de moelle osseuse allogénique.

Parce qu'un seul gène défectueux est habituellement responsable du phénotype de la maladie, un accent est mis sur le développement d'ADNc et d'ARN thérapies utilisant un vecteur viral ou non viral.^{72, 73}

Beaucoup de ces études ciblent les cellules souches kératinocytaires. En outre, les techniques doivent être améliorés en termes d'efficacité clinique avant leur application chez les patients. Ainsi, la thérapie ex vivo génétique / cellulaire cutané utilise des cellules épidermiques humaines en combinaison avec une correction d'ADNc rétroviral est considérée comme le moyen le plus attrayant pour le traitement des patients atteints d'EB, ainsi que plusieurs autres techniques.

A. La thérapie génique dans l'épidermolyse bulleuse dystrophique

Depuis le début des années 2000, des études utilisant des vecteurs non viraux, viraux et thérapie génique à médiation de phage, ont été utilisés pour l'expression ectopique de C7 « COL7A1 » dans les cellules dérivées de patients RDEB « Recessive dystrophic epidermolysis bullosa ».

Plus récemment l'apparition de plateformes hautement qualifiées et l'évolution de la génétique ont permis le développement de thérapies génétiques ciblées ainsi que leurs applications.

Dans la peau humaine, à la fois les kératinocytes et les fibroblastes synthétisent des chaînes α 1C7 qui forment une molécule homotrimérique C7. Les cellules sécrètent alors des molécules C7 dans le haut espace extracellulaire dans la papille dermique.

- Structure d'une molécule de collagène

- (A) Chaîne α (une sphère = un acide aminé)
- (B) 3 chaînes α

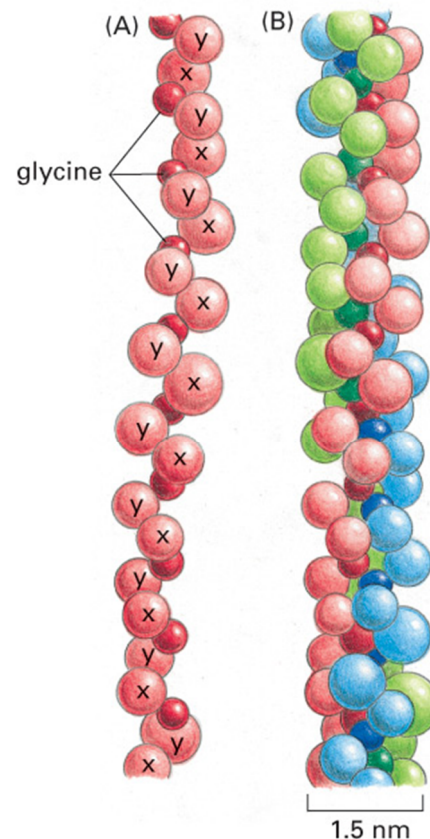


Figure 19–43. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 26: structure du collagène

On ne sait pas comment le C7 joue un rôle dans l'ancrage au niveau du derme papillaire pour obtenir une jonction dermo épidermique afin de former les Fibrilles d'Ancrage, mais nous avons démontré que le C7 a des domaines de

liaison spécifiques pour le collagène de type IV et la laminine 332 dans la JDE « jonction dermo épidermique » (Chen *et al.*, 1997, 1999).

Par conséquent, le C7 se lie probablement à des composantes de la JDE, se condense en dimères antiparallèles pour former les fibrilles d'ancrage.

En utilisant le modèle de guérison d'une souris saine et d'une autre RDEB on a pu conclure qu'il est impératif d'avoir du C7 dans le haut de la papille dermique. Il sera auto assemblée et formera des fibrilles d'ancrages correctement localisées. (Chen *et al.* 2002 ; Ortiz-Urda *et al.* 2003 ; Remington *et al.* 2009 ; Wang *et al.* 2013 ; Woodley *et al.* 2003, 2004, 2007, 2013a).

Le traitement ultime pour la RDEB peut être la thérapie génique, à condition que le tissu greffé au patient RDEB possède des cellules corrigées avec un gène COL7A1 normal et expriment un C7 fonctionnel normal. Le gène COL7A1 est assez grand, plus de 9 kb, ce qui dépasse la capacité de transport de la plupart des vecteurs viraux.

1. Transfection par plasmide d'ADN

La grande taille du gène COL7A1 (32 kb) et d'ARNm ou ADN (ADNc) complémentaire molécules de (9 kb) ne peuvent être transportés par des vecteurs de taille restreinte.

Les thérapies à base de plasmides sont en grande partie utilisées vu leur capacité de transport, ils ont été utilisés pour livrer la longueur totale du COL7A1 ADNc (C7) directement dans l'épiderme de rats par des injections locales. Cependant, seule une petite population de kératinocytes a exprimé le C7 et la durée de l'expression s'est limitée à 1 semaine. (76)

Dans une autre expérience, le chromosome artificiel P1 dérivé contenant la totalité du locus COL7A1 humain de 32 kb et son voisin génomique séquencé dans les kératinocytes de RDEB immortalisés ont été micro-injectés, cette expérience a démontré la biosynthèse soutenue et la sécrétion du pro collagène VII jusqu'à 1 an Mecklenbeck et al. (77)

Bien que ces résultats ont apporté la preuve que l'ADN génomique pourrait restaurer la production du C7, les chromosomes artificiels P1 dérivés sont souvent intégrés à plusieurs endroits chromosomiques.

Ainsi, bien qu'elle a démontré la faisabilité de la transfection de l'ADN génomique du COL7A1, cette étude a également démontré la nécessité de procéder par des techniques de dépôt plus efficaces et un contrôle plus précis des sites d'intégration.

2. Transduction virale et à médiation de phage

Les vecteurs viraux ont toujours été les vecteurs de choix pour les études de thérapie génique RDEB. Les vecteurs Rétroviraux (RV) et lentiviraux (LV) sont capables de s'intégrer dans le génome de l'hôte pour permettre une expression génique stable et à long terme, mais la capacité de transport limitée de ces vecteurs peut grandement influencer les titres et les taux de transfert de gènes.

En 2000, Chen et al ont utilisé un vecteur rétroviral avec un COL7A1 tronqué " mini-génie " pour tenir compte de ces limitations de taille. Ils ont été en mesure de démontrer que les kératinocytes immortalisés RDEB pourraient être transduits pour exprimer un produit protéique mini-C7. Celui-ci a amélioré le phénotype RDEB via la normalisation de la motilité cellulaire, l'adhésion cellulaire, et les taux de prolifération. (78)

En 2002, ce même groupe a utilisé un SIN « self-inactivating » vecteur basé sur les lentivirus inactivés pour fournir une séquence d'ADNc COL7A1 de longueur totale dans des kératinocytes et des fibroblastes provenant de patients RDEB.¹³

Ils ont rapporté 95% d'efficacité de transduction et ont démontré la persistante de la synthèse et la sécrétion du C7 Normalement dans les 5 mois d'observation in vitro.

Au cours de la période d'étude de 2 mois, ces cellules corrigées étaient capables de produire des fibrilles d'ancrage normales lors de la greffe sur des souris immunodéficientes.

En 2003, Baldeschi et al (79) ont rapporté la première utilisation d'un vecteur rétro viral pour la transduction d'une séquence d'ADNc de COL7A1 dans des kératinocytes RDEB sur toute sa longueur, tout en apportant la preuve que les cellules souches épidermiques peuvent être corrigées avec succès.

En utilisant un système de lentivirus à médiation similaire que celle de Chen et al, (78) ils ont effectué des injections intradermiques de fibroblastes corrigés dérivés de patients RDEB pour restaurer le C7 dans la JDE pendant 4 mois dans un modèle de peau de RDEB. Woodley et al, (80) 14 (2003)

Ce groupe a ensuite démontré que les injections intradermiques directes d'un vecteur de LV contenant le COL7A1 ADNc pourraient produire une expression stable du C7 humain par les fibroblastes et les cellules endothéliales pendant au moins 3 mois dans un modèle murin. (80)

L'utilisation de longues répétitions terminales ou des promoteurs exogènes dans les SIN LVs et les techniques d'expression à base d'ADN peut se traduire

par l'expression du gène soutenue qui ne sont pas soumis aux mécanismes de régulation cellulaires.

Compte tenu du potentiel du C7 à contribuer à la fibrose, l'expression du gène incontrôlée peut être préjudiciable. En outre, les deux RV et LVs montrent un biais vers l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives du génome. (81)

Ces facteurs soulèvent des préoccupations importantes pour les  v nements indésirables liés à la mutag nese par insertion, qui ont été document s dans les précédents essais de thérapie génique de transduction par des vecteurs rétroviraux et qui ont abouti à la leuc mogen se induite par le vecteur. (82), (83)

Malgré ces coups durs encaissés antérieurement, la thérapie génique médiée par les virus, les améliorations les plus récentes en matière de conception des SIN LV ont montré leur intérêt dans les études pilotes pour les maladies monogéniques sans l'apparition de phénotypes induits par mutag nese d'insertion manifestes. (84), (85)

En tant qu'alternative à la transduction virale médiée Ortiz Urda et al 6 (2002) utilisèrent une technique par médiation de phage pour délivrer l'ADNc du COL7A1 dans des cellules progénitrices de l'épiderme dérivée d'un patient RDEB.

Les auteurs utilisent un phage intégrase phiC31, qui peut intégrer de grandes séquences d'ADN (jusqu'à 10 kb) contenant une séquence spécifique " attB 285 pb génomique " dans des sites pseudo-attP ". La plupart des clones de souches épidermiques avaient intégré le COL7A1 à des endroits prévisibles sur la base des sites attP pseudo-connus.

Des intégrations aléatoires ont également été observées, mais aucune ne se trouvaient dans les régions de gènes codant. Cette technique avait relativement un plus faible taux d'efficacité de transfection (Environ 45% à 2 jours) que celle précédemment rapportée (la transduction virale), mais grâce à l'expansion et la sélection des cellules C7-productrices en culture, les auteurs ont été en mesure d'atteindre un taux de réussite de 99 % après une période de sélection de 10 jours.

La contribution de la production de C7 par des cellules progénitrices de l'épiderme a été suggérer par l'expression persistante pendant 14 semaines, couvrant ainsi de multiples cycles de renouvellement de kératinocytes. (86)

Ce groupe a publié une étude de suivi, dans laquelle la même technique de phage intégrase phiC31 a été utilisée pour corriger les fibroblastes provenant de patients RDEB. Les fibroblastes corrigés ont ensuite été injectés dans un modèle de peau de RDEB et ont été montrés la restauration du C7 dans la JDE. (87)

Cependant, l'exigence du gène de l'intégrase phiC31, l'absence de réactivité de la régulation du gène endogène, et le potentiel de mutagenèse par insertion aléatoire peuvent être des facteurs de limitation de thérapie par les phages.

Contrairement aux vecteurs viraux, des vecteurs adénoviraux existent en tant qu'éléments extra chromosomiques qui peuvent transporter de grandes tailles de prêt (35 kb).

Cette technique serait plus favorable à transférer l'ADNc du COL7A1 aux côtés des éléments promoteurs naturels pour créer un environnement réceptif aux signaux localisés pour la régulation des gènes.

Cependant, les propriétés immunogènes de cette technique ainsi que sa localisation extra chromosomiques, limitent son expression à la durée de vie du type de cellules transduites, sont tous deux des facteurs limitants l'utilisation généralisée de cette plate-forme. (88), (89)

À la différence des vecteurs adénoviraux, les adéno-associated virus (AAV) sont capables d'intégrer dans le génome de l'hôte. Bien qu'ils ne peuvent accueillir de grandes insertions de vecteurs, les AAV sont considérés comme un moyen beaucoup plus fiable avec un risque relatif moindre par rapport à une autre source virale. (90)

3. Edition de gènes.

Les limites des thérapeutiques localisées cellulaires et protéiques, et des vecteurs de thérapie génique ont démontré que l'édition de gène par nucléases reste une option intéressante pour le traitement de RDEB.

Ces réactifs peuvent être rationnellement conçus et fabriqués pour la médiation d'une pause de brin d'ADN en un lieu défini par l'utilisateur qui entraîne une hausse des taux de recombinaisons homologues de 100 à 1000 fois. (91), (92)

Les techniques candidates pour l'édition de gène comprennent les doigts de zinc nucléases (ZFN), les (TALENs) et les (CRISPR) -Cas9 nucléase système.

Les fonctions des ZFNs, TALENs, et cas9 CRISPR sont similaires, ils se lient tous à une séquence d'ADN définie par l'utilisateur et permettent la pause d'une séquence dans l'un ou l'autre brin d'ADN comme précédemment décrites (Figures 3, 4, 5).

La taille relativement petite des ZFN les rend très flexibles pour une utilisation dans de nombreuses techniques de transfert de gènes ; Toutefois, l'achat requis et l'industrie, l'affiliation ou l'acquisition de matières premières spécialisées et la production méthodologique, pourraient restreindre leur utilisation à grande échelle.

Semblable aux ZFNs, les protéines Tales des TALENs fonctionnent sous forme de dimères qui sont attachés à la nucléase Fok ; Toutefois, la région où se produit le clivage est plus grande. (93), (94)

Pour déterminer si TALENs peuvent être applicables à la correction de gène RDEB, les chercheurs ont découvert des protéines reconnaissant les séquences proximales à un PTC (premature termination condons) homozygote dans l'exon 14 du gène COL7A1.

Le TALENs ainsi qu'une séquence plasmidique donatrice exogène couvrant les exons 12-15 ont été introduits dans des fibroblastes primaires provenant de patients. Des recombinaisons homologues spontanées ont été observées chez 44% (8 sur 18) des clones lorsque le système a été livré par les TALEN plutôt que par l'ADN plasmidique, et 12,5% (2 sur 16) des cas où il a été livré comme ARNm.

Cinquante pour cent des clones présentant des signes de réparation homologues par l'intermédiaire du système de distribution d'ADN plasmidique.

Les fibroblastes corrigés ont été reprogrammés pour être pluripotents et ont réussi à former des structures similaires à la peau contenant le C7 localisé à la JDE dans un test in vivo. (95)

La technique d'édition de gènes la plus récemment décrite est le système CRISPR-cas9 très convivial. Ceci est un système immunitaire adaptatif bactérien qui est mobilisé en réponse à l'infection par le phage comme précédemment décrits.(96)

Il fonctionne comme une endonucléase d'ARN guidée comprenant un petit ARN transcrit de guidage (ARNg) qui est associé à la protéine cas9, celle-ci contient 2 domaines de nucléases qui clivent les brins individuels d'ADN. (97)

Le système CRISPR-Cas le plus couramment utilisé est dérivé du *Streptococcus pyogenes* et utilise un clivage spécifique du site par Watson-Crick de la cas9-gARN à une extrémité proximale de la séquence cible d'un motif adjacent de clivage, ce qui est essentiel pour la spécificité de liaison cas9. (96)

Le motif adjacent de la séquence de clivage est hétérogène entre les différents systèmes CRISPR-cas, avec le système *S. pyogenes* en utilisant un motif NGG (où N for any nucléotidique et G représente guanine) et une séquence de reconnaissance de la cible complète de G (N19) -NGG.

L'utilisation de ZFN, TALENs, et des systèmes CRISPR-CAS sera finalement entraîné par la disponibilité des cibles géniques selon les fréquences et les spécificités. Par exemple, les capacités de ciblage de ces 3 systèmes au sein du génome sont fondamentalement différentes : 1/500 pour ZFNs et 1/35 pour les TALENs, alors que *S. pyogenes* systèmes CRISPR-Cas peuvent cibler 40% des exons humains. (97), (98)

Par exemple, la spécificité des réactifs générés au niveau du locus CCR5 ont montré des effets hors-cible au niveau du locus CCR2, qui partage un site de

liaison homologue avec le CCR5 (le CCR 5 est un récepteur cellulaire présent chez les lymphocytes). (99) , (100)

Ces résultats soulignent l'importance de la rigueur du choix du site cible et l'analyse de sélection qui mettent l'accent sur hétérogénéité des séquences. Ces stratégies de conception peuvent être combinées avec les architectures optimisées et des méthodologies d'identification des sites hors cible ultrasensibles pour soutenir l'utilisation de la traduction de ces systèmes. (101) , (102), (103)

La cible du locus du COL7A1 a également été démontrée par Sebastiano et al en 2014. (79)

Deux lignées cellulaires dérivées de patients RDEB présentant des mutations dans les exons 2 et 3 du locus COL7A1 ont été ciblés par un système médiée par AAV de 6 exons et contenait 1,4 kb et a ciblé un bras de chaque côté d'une cassette de sélection à la puromycine central.

En comparaison avec un vecteur de ciblage plus grand, plus classique à 8,8 et 4.4 bras kb couvrant 31 exons, le système d'AAV médié produit de plus grandes fréquences de recombinaison (56% [17 sur 30 clones] et 16% [1 sur 6 clones] pour 2 lignes de patients), avec des clones ciblés étant corrigés avec succès à 6% (1 sur 17) et 100% (1 sur 1) de ces événements de recombinaison. G-banding analyses ont confirmé des caryotypes normaux qui affichent la correction, tandis que le southern-blot et le séquençage Sanger ont confirmé l'absence d'événements d'intégration aléatoires dans le locus COL7A1.

Fait important, les types de cellules modifiées dans ces expériences étaient iPSCs « induced pluripotent stem cells » dérivés de kératinocytes et de

fibroblastes RDEB. Les iPSCs corrigées ont ensuite été transformées en kératinocytes corrigés, qui ont été utilisés pour créer des greffes autologues épithéliales avec une composition du C7 normale.

En outre, par génotypage de 13 gènes connus de cellules squameuses carcinomateuses prédisposantes dans chaque lignage, les chercheurs ont été en mesure de créer un système de contrôle par lequel les cellules corrigées présentant la plus faible charge mutationnelle pourraient être appliquées aux greffes autologues.

Vers la réalisation du plein potentiel de l'édition de gène, des stratégies futures peuvent maximiser les taux de réparation homologue dirigé à l'aide de nucléases pour générer des cassures d'ADN dans le contexte de molécules donneuses à base d'AAV recombinés. (104)

Fait intéressant, certaines cellules de patients atteints de RDEB abritent des populations de cellules contenant des allèles COL7A1 normaux dans parties du tissu cutané ceci est un phénomène dénommé "mosaïsme".'' (105), (106), (107)

Ces populations de cellules peuvent offrir la possibilité de contourner les procédures d'édition de gènes en isolant et en cultivant ces sous-populations pour une autogreffe par la suite. Cette méthode sera plus développée dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle

4. Livraison thérapeutique des cellules autologues corrigé pour RDEB

Les futures modalités de traitement seront très probablement de nature combinatoire. Pour le traitement localisé, combinant l'édition de gènes avec l'ingénierie tissulaire de greffons en 3 dimensions.

En greffant ce tissu sur des sites d'implication, les effets locaux de soutien peuvent être atteints. Cependant, le coût financier et temporel des procédures répétées de greffage, la fragilité du tissu épidermique créé en ex vivo, et l'excision du tissu blessé avant la greffe avec un potentiel de cicatrisation subséquente sont toutes les limites possibles de cette approche localisée. (108)

Le concept combinatoire peut être élargi pour inclure la fusion des techniques localisées et systémiques à l'aide de gènes corrigée des progéniteurs hématopoïétiques.

La possibilité d'utiliser des nucléases d'édition de gènes dans les CSH a récemment été décrite par Genovese et al dans les déficits immunitaires sévères (109) et représente une stratégie pour la thérapie ex vivo visant à atténuer la toxicité liée à la transplantation.

Que ce soit la prochaine génération de thérapies locale, systémique, ou les deux, que ce soit destiné aux atteintes limitées ou pour un patient présentant des lésions généralisées sévères, elles se basent sur la correction du gène de mutations COL7A1 dans les fibroblastes RDEB, kératinocytes, cellules souches mésenchymateuses, ou CSH, ce qui implique un processus en plusieurs étapes complexes.

Pour être utile dans la clinique, ces mesures, y compris la conception, la production et la livraison d'outils moléculaires ; la préparation et l'expansion des cellules pertinentes ; et le greffage local ou systémique des cellules génétiquement modifié ceci doit être validé et simplifiée.

B. Thérapie génique dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle

EBJ peut être divisée en deux formes cliniques : Herlitz (H-JEB) et non-Herlitz (NH-JEB). Le diagnostic H-JEB est accompagné par la mort du patient dans la première année de la vie, tandis que les patients avec NH-JEB ne subiront aucun effet négatif sur leur durée de vie globale.

La laminine-332 est composée de trois sous-unités polypeptidiques codées par les gènes LAMA3, LAMB3, et LAMC2. La plupart des patients atteints de JEB portent une mutation au sein de ces gènes.

Généralement, une corrélation génotype / phénotype est apparente dans les deux Variantes JEB. En H-JEB, des codons stop prématurée dans les deux allèles de l'un des gènes de la laminine-332 sont à l'origine du phénotype sévère de la maladie.

Dans cette partie on se basera sur la thérapie génétique ex vivo qui est la principale méthode en études pour pouvoir traiter l'EBJ.

En 2006, Mavilio et al. Rapportaient le premier succès génique de l'ex vivo / cellulaire thérapie chez un patient souffrant de JEB causé par des mutations dans la sous-unité LAMB3 de la laminine-332. (110)

En revanche des mutations faux-sens dans les gènes codant pour la laminine-332 sont souvent la cause de NH-JEB. (75), (111)

Dans la première phase I / II des essais cliniques pour de jonction EB, les cellules souches kératinocytaires d'un patient NH-JEB étaient génétiquement corrigées en utilisant un vecteur rétroviral portant le gène exprimant la longueur totale du LAMB3 ADNc.

Leurs culture a permis l'obtention d'un lambeau cutané qui sera ensuite greffer sur les jambes du patient, on obtiendra alors une peau saine est complètement fonctionnelle. (110)

L'étude a révélé que la survie d'un petit nombre de cellules souches de la peau transplantée sur le patient a été suffisante pour restaurer la fonction normale de la peau.

Une période de suivi de plus de 8 ans a démontré une synthèse de la protéine cible LAMB3, ainsi que le rétablissement de l'adhésion ferme de l'épiderme.

Il n'y a pas preuve de formations de bulles, d'inflammation, de formation de tumeurs, ou de réponse immunitaire chez le sujet greffé. (112)

En Juillet 2014, nous adoptions le même protocole de thérapie génique pour un patient autrichien JEB en collaboration avec le Centre pour la médecine régénérative à Modène, Italie (Fig. 1A), pour lequel nous avons obtenu l'approbation des autorités autrichiennes en 2011.

Ceci est la deuxième utilisation de l'ex thérapie génique in vivo de la peau le ciblage des cellules souches autologues kératinocytaires après que de Mavilio et al.

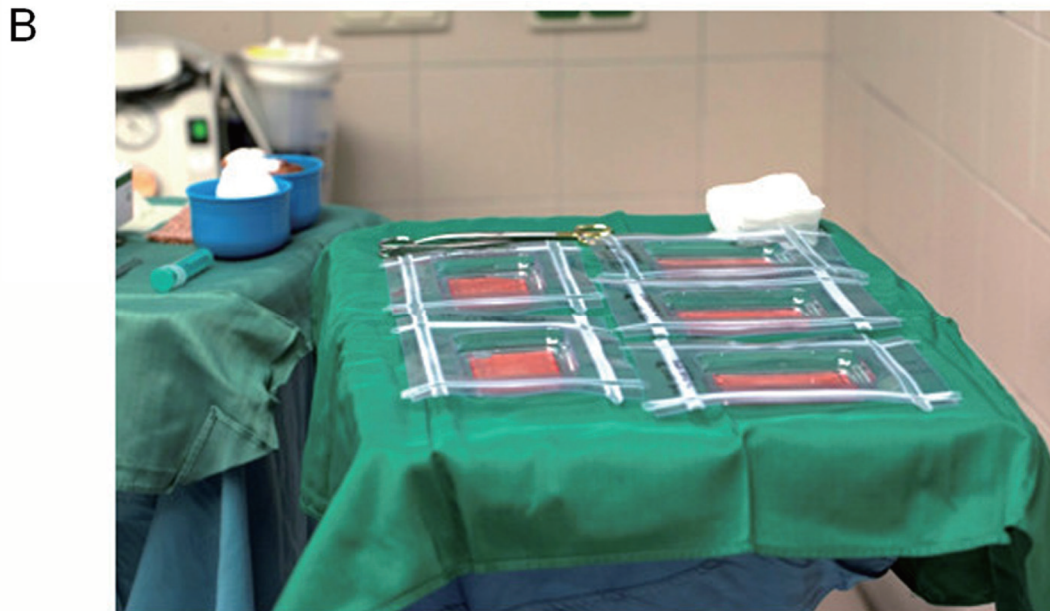
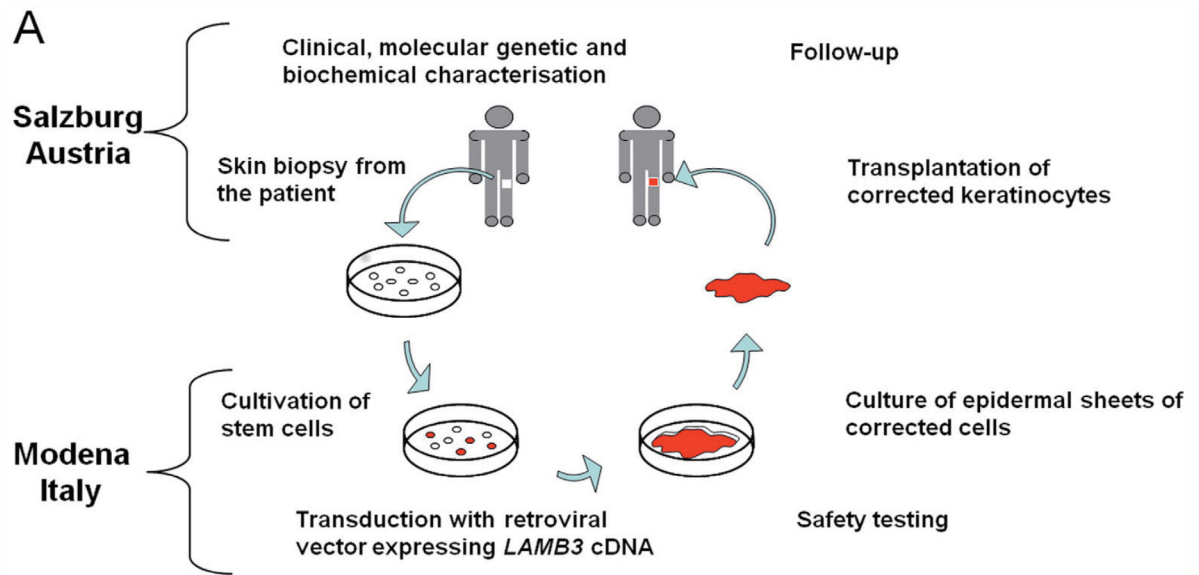


Figure 27: thérapie ex vivo de kératinocytes

Cinq lambeaux de peau (Fig. 1b), chacun mesurant 5×7 cm, ont été greffés sur les zones atteintes du patient sur les cuisses. Nous évaluons actuellement le patient selon le protocole dans la 1^{ière} année post-transplantation pour le suivi.

Certains individus avec EB, cependant, ont des zones cutanées saines et montrent une expression accrue de la protéine qui n'est pas exprimée dans la plupart des domaines de leur peau. (113), (114)

Ce phénomène, appelé mosaïque révertant, où la thérapie de gène naturelle, pourrait empêcher les réactions immunitaires contre la protéine nouvellement synthétisée résultant de thérapie génique.

En outre, la présence de mosaïsme les zones "en bonne santé « peuvent être sources de cellules souches et peuvent être exploitées pour développer une thérapie à base de cellules sans nécessiter de correction de gène.

Cependant, les tentatives de culture de ces kératinocytes d'un patient atteint NH-JEB, obtenir un lambeau suffisant pour une greffe de peau, et la greffe de celui-ci au niveau des zones atteintes de la peau ne réussit pas à cause du faible taux de kératinocytes sains dans le tissu cultivé. (115)

Par conséquent, les protocoles doivent être développés pour sélectionner plus efficacement les kératinocytes sains dans la culture afin de produire des greffons contenant un nombre suffisant de cellules souches fonctionnelles pour assurer la réparation de la peau.

Ainsi la greffe cutanée reste le traitement de choix le plus prometteur puisqu'il permet de palier au déficit génétique à long terme.

Résultats des études en cours décrites ci-dessus vont ouvrir la voie à la thérapie génique ex vivo / cellulaire pour qu'elle devienne une option réaliste chez les patients souffrant EB ou d'autres pathologies génétiques.

II. Thérapies en investigation dans le Xeroderma Pigmentosum

Le Xeroderma Pigmentosum est une génodermatose de transmission autosomique récessive, il est caractérisé par une sensibilité accrue aux UV et à la lumière du soleil.

Un vieillissement accéléré de la peau est observé chez les patients ainsi que l'apparition de brûlures, de troubles de la pigmentation et le développement inévitable de lésions des yeux et de la peau pouvant conduire à de multiples cancers (Figures : 28, 29 et 30).

Cette pathologie est liée à un défaut dans les gènes du système de réparation par excision-resynthèse des nucléotides (nucleotide excision repair, NER) pour les sept premiers groupes génétiques (A–G), et à une anomalie des gènes de la transcription pour le huitième groupe (Xeroderma Pigmentosum variant, XPV).

Des tableaux cliniques variables sont observés en fonction du temps, des patients et des différents groupes de complémentation. Ainsi les patients atteints de la forme XPA présentent généralement une symptomatologie très sévère avec des anomalies neurologiques importantes alors que les patients souffrant de la forme XPE présentent des symptômes relativement légers et pas de trouble neurologique.

L'évolution de la morphologie des éruptions dans le temps est étroitement liée à l'exposition au soleil. Les premiers signes de cette hypersensibilité se manifestent vers 1-2 ans par l'apparition de brûlures à la suite à d'une exposition au soleil même légère.



Figure 28: Stade de début de xeroderma pigmentosum (her).

Plus tard, apparaissent des lésions cutanées telles que sécheresse, tache de rousseurs et télangiectasies. (Figure 29)



Figure 29: Xeroderma Pigmentosum (Stade de l'érythème persistant s'accompagnant de macules achromiques) (HER).

La survenue de cancer de la peau sur les zones exposées est fréquente chez les patients atteints de Xeroderma Pigmentosum. L'âge médian pour l'apparition de ce type de lésion est 8 ans.



Figure 30: STADE DEPASSE DE XERODERMA PIGMENTOSUM AVEC CANCER CUTANE(HER).

Par ailleurs, certains patients souffrent de troubles de la vision (photophobie, ectropion...), et un cinquième des patients présente en plus des troubles neurologiques (troubles de la marche, aréflexie, retard mental...).

Les huit gènes responsables des différentes formes de XP étant aujourd'hui bien connus et les chercheurs sont aujourd'hui capables de reconstituer une peau « XP » en laboratoire.

Grâce à cette avancée, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la maladie peuvent être analysés en détail. De nouvelles pistes thérapeutiques sont ainsi envisagées ou en cours d'évaluation.

Selon la stratégie, le développement de ces thérapies est plus ou moins avancé.

A. Thérapie génique ex vivo

La thérapie génique pour le Xeroderma Pigmentosum est encore à un stade théorique et expérimental. Diverses méthodes de correction des défauts de Xeroderma Pigmentosum ont été tentées in vitro et chez l'animal.

Ces méthodes utilisent des vecteurs viraux (adénovirus et rétrovirus) pour la modification génique des cellules du patient. La thérapie génique ex vivo de la peau, qui correspond à une greffe de peau génétiquement modifiée, pourrait dans l'avenir avoir sa place dans le traitement de Xeroderma Pigmentosum.
(116)

La première analyse génétique de patients XP a été réalisée par fusion de cellules somatiques suivie d'une analyse de la restauration de l'UDS « unscheduled DNA synthesis ».

Le but de l'essai synthèse non programmée de d'ADN (UDS) sur les cellules de foie de mammifères in vivo est d'identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN après excision et élimination d'un segment

d'ADN contenant la région endommagée par l'agent physique ou chimique (solides ou liquides).

Ces expériences ont permis l'identification des sept groupes de complémentation XP classiques et du groupe variante. Cela implique que les carences en réparation de l'ADN peuvent être corrigées par l'introduction d'une copie normale du gène défectueux, ouvrant la voie aux protocoles de thérapie génique pour les patients XP.

Il a en effet été démontré que l'introduction d'une copie normale du gène défectueux grâce à des vecteurs d'expression classiques, par précipitation de calcium ou par micro-injection dans les cellules XP peut permettre la complémentation de la capacité de réparation de l'ADN.

En 1995, les vecteurs viraux ont d'abord été utilisés comme outils de transfert de gènes dans les expériences de réparation de l'ADN. Cette année-là une étude décrivait l'utilisation d'un vecteur rétroviral LXPDSN portant le gène de type sauvage XPD capable de complémenter des fibroblastes primaires de patients XPD avec une expression à long terme. (117)

Une étude ultérieure a montré que cette complémentation était spécifique du gène et qu'il y avait une expression à long terme du transgène. (117)

L'utilisation de vecteurs rétroviraux pour la délivrance de gènes de réparation de l'ADN a ensuite été validée en 1996 et 1997, alors que les cellules XPA, XPB, XPC et TTD ont également été complémentées grâce à des vecteurs rétroviraux gène-spécifiques. (117)

La compilation de ces résultats montre que la délivrance rétrovirale de plusieurs gènes de réparation de l'ADN a permis la complémentation

/compensation de plusieurs caractéristiques présentées par les patients XP mais aussi CS (Syndrome de Cockayne) et TTD (Trichothiodystrophie) :

- Diminution de l'UDS
- Réduction de l'activité de catalase
- Sensibilité aux UV
- Diminution de la synthèse de l'ARN

- Augmentation de la fréquence des mutations Les patients XP subissent souvent des greffes autologues de peau après retrait massif de tissus.

La plupart des recherches dans le domaine de la thérapie génique pour XP ont ainsi été focalisées sur la reconstruction tridimensionnelle de la peau in vitro, en utilisant des cellules génétiquement corrigées ex vivo. Le groupe C sera le plus étudié vu que l'atteinte se limite à la peau.

Les actualités thérapeutiques du Xeroderma Pigmentosum dans cette technique, les fibroblastes et les kératinocytes des patients (biopsie de peau d'une zone non UV irradiée) sont cultivés in vitro. Ensuite, les vecteurs rétroviraux sont utilisés pour compléter de manière stable la déficience génétique de ces cellules. Enfin, les kératinocytes et les fibroblastes sont utilisés pour reconstruire les trois dimensions respectivement de l'épiderme et du derme.

Cette construction peut ensuite être utilisée comme une greffe lorsqu'une partie de peau lésée est excisée. A l'aide d'un vecteur rétroviral transportant une copie normale du gène XPC Arnaudeau-Bégard et son équipe ont ainsi réussi à compléter des kératinocytes XPC, aboutissant à un phénotype de type sauvage et une résistance aux UV. (117)

Par ailleurs, une autre équipe a développé en 2007 une méthode de sélection des kératinocytes génétiquement corrigés qui ne comporte pas de particules provenant de micro-organismes (qui présentent un risque de reconnaissance immunologique du transgène). Cette méthode utilise le CD24 comme marqueur ectopique. (117)

En 2005, une autre équipe a pu reconstituer un modèle de peau tridimensionnel in vitro en utilisant des fibroblastes et des kératinocytes provenant d'un donneur XPC. Ce modèle a permis l'observation de caractéristiques spécifiques de la peau XP :

- Hypoplasie des couches cornées,
- Différenciation des kératinocytes diminuée et retardée
- Invaginations épidermiques
- Contrôle de la prolifération généralement altéré
- Morphologie et orientation des fibroblastes distinctes.

En outre, il a été démontré que les invaginations épidermiques étaient liées à une altération de la fonction des kératinocytes et des fibroblastes. Elles ont été caractérisées comme structures épidermoïdes « carcinome-like ».

La biopsie de peau XP pourrait permettre l'accès à des connaissances plus précises de la physiologie de la peau XP, mais il s'agit d'une procédure délicate qui requiert l'accord des patients. (117)

L'utilisation de vecteurs rétroviraux communs en thérapie génique peut cependant être dangereuse en raison des mutagenèses insertionnelle semi aléatoire (risque de cancérogénèse). Dans ce contexte, les chercheurs ont

développé plusieurs vecteurs « auto-inactivating lentiviral » portant les gènes de réparation d'ADN.

Ces vecteurs ont permis une transduction efficace et une transformation de fibroblastes primaires, en complétant de manière spécifique les gènes de cellules XPA, XPC et XPD. Par ailleurs, les cellules transduites ont montré un niveau normal de résistance aux UV persistant pendant au moins 3 mois. (117)

La reconstruction tridimensionnelle de peau XP génétiquement corrigée, suivie de l'implantation chez un patient de la greffe (figure) est toujours une action très délicate et difficile pour le patient. Cette étape doit être menée avec beaucoup de prudence, en priorisant le bien-être du patient. (117)

Les fibroblastes et kératinocytes issus de la peau d'un patient XP seront cultivés in vitro, et transduits avec le vecteur rétroviral transportant l'ADNc XP de type sauvage.

Les cellules transduites sont ensuite utilisées pour reconstruire la peau humaine in vitro, avec un phénotype normal. La ligne en pointillée suggère la possibilité d'une greffe de la peau reconstruite directement sur les patients XP.

Il est également important de noter que ces greffes ne concernent pas les mélanocytes, responsables des mélanomes, très fréquents chez ces patients. (117)

De plus, la peau n'est génétiquement corrigée que dans les régions qui reçoivent les greffes, toutes les autres zones du corps restent extrêmement photosensibles puisque aucun effet paracrine n'est connu pour les protéines de réparation de l'ADN et que le franchissement immunologique ou gene silencing

par méthylation cellulaire peut toujours empêcher une expression du transgène à long terme.

De plus, certains groupes de complémentation XP présentent également d'autres symptômes caractéristiques, tels que les maladies neurodégénératives, qui ne seront pas améliorés par les greffes de peau.

Pour ces patients, un autre type de thérapie génique pourrait être plus efficace, comme le développement de cellules souches génétiquement corrigées (ESs) ou des cellules pluripotentes induites (iPSCs). (117)

Malheureusement, il n'existe encore aucune référence sur ce genre de la recherche pour Xeroderma Pigmentosum.

B. Les approches de la thérapie génique ciblée : Utilisation des méganucléases pour la correction des cellules XPC

Il existe plusieurs techniques pour cibler, remplacer ou corriger un gène spécifiquement, ce qui diminue le risque de mutagenèse d'insertion : C'est l'utilisation de recombinaisons, de transposons, de nucléases en doigts de Zinc, d'endonucléases et de méganucléases comme précédemment décrites.

Les méganucléases peuvent fonctionner comme des ARN maturases, facilitant la maturation de leur propre intron, et comme des endonucléases spécifiques capables de reconnaître et de cliver la séquence de jonction exon-exon dans laquelle leur intron réside. Elles créent ainsi une rupture double brin spécifique (DSB pour double strand break), donnant naissance au moniker "Endonucléase homing ».

Les méganucléases peuvent ainsi être utilisées comme outils de ciblage de gènes. Idéalement, elles peuvent fournir une réversion de la mutation, mais

l'efficacité de la correction est inversement corrélée à la distance du premier DSB.

Alternativement, il est possible d'insérer un gène fonctionnel en amont du gène muté dans un endroit où il ne risque pas de provoquer de mutagenèse insertionnelle. Par ailleurs, les méganucléases peuvent être utilisées pour introduire des mutations spécifiques à des fins de recherche telles que la compréhension du rôle d'un gène ou d'une mutation ponctuelle particulière.

Des méganucléases capables de cibler des séquences virales sont également à l'étude comme agents antiviraux. Récemment, la conception d'une méganucléase I-Crel spécifique ciblant le gène XPC a permis de cibler spécifiquement deux séquences XPC.

Pour la première fois, le redesign d'une endonucléase in vitro montrait une capacité de modification d'une région spécifique du chromosome sans perte de spécificité ou d'efficacité. Ces résultats sont très prometteurs pour le développement de futures stratégies de thérapie génique pour les patients XP.

C. Effets potentiels des adjuvants de la réparation de l'ADN

L'utilisation d'adjuvants de la réparation de l'ADN et d'antioxydants peut également contribuer à réduire l'incidence des cancers de la peau chez les patients XP.

Certains adjuvants connus de la réparation de l'ADN sont le sélénium, l'extrait d'*Urcaria tomentosa* (griffe du chat) et l'interleukine12 (IL- 12). (117)

Le sélénium semble interagir avec Ref-1, activant p53, induisant la réparation de l'ADN par la voie p53, d'une manière dépendante de BRCA1, portant principalement sur le stress oxydatif.

D'autre part, il a été déjà signalé que des niveaux élevés de sélénium peuvent être mutagènes, cancérigènes et tératogènes éventuellement, probablement dus à la substitution non-spécifique du soufre sur les protéines et par conséquent une diminution de l'activité du TCNER. Ainsi, une attention particulière doit être accordée en ce qui concerne la dose de sélénium en supplémentation alimentaire.

L'extrait d'*Urcaria tomentosa* semble augmenter l'élimination des lésions CPD et réduire les dommages oxydatifs, soit en favorisant la réparation par excision de base (BER) soit par une propriété antioxydante, réduisant ainsi les érythèmes et les cloques après exposition aux UV. Malgré plusieurs études in vitro et in vivo, les mécanismes précis sont encore inconnus.

Enfin, l'IL-12 est capable, en plus de ses propriétés immunomodulatrices, de prévenir l'immunosuppression induite par les UV (par inhibition d'IL-10), il est également capable d'augmenter la réparation de l'ADN en induisant le mécanisme du NER, comme le montre l'augmentation du niveau d'ARN dans certaines molécules du NER. (117)

En 2015 Christiane Kuschal et al ont corrigé les codons stop en utilisant des aminoglycosides dans les cellules du groupe de Xeroderma Pigmentosum patients C avec des résultats très prometteurs. (118)

D. Utilisation de cellules pluripotentes induites (iPSC) comme agents de thérapie génique

Les cellules souches pluripotentes induites (en anglais iPS Cells pour Induced Pluripotent Stem Cells) sont des cellules souches pluripotentes fabriquées en laboratoire, depuis des cellules humaines adultes (voir Figure 31).

L'induction de cellules pluripotentes (iPSC) par l'expression d'Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 dans des fibroblastes a donné l'espoir d'une nouvelle thérapie génique pour Xeroderma Pigmentosum.

En effet, l'utilisation de cellules pluripotentes dans cette indication ne provoquerait pas de réponse immunologique chez les patients, car leurs propres cellules seraient utilisées pour l'induction des iPSC.

De plus, cette approche ne serait pas confrontée à des questions éthiques telles que l'utilisation de cellules souches embryonnaires. « Ceci viens d'être permis en 2016 en Grande Bretagne »

Depuis lors, cette technologie a été améliorée et des iPSC ont été induites pour une grande variété de types cellulaires provenant d'espèces différentes.

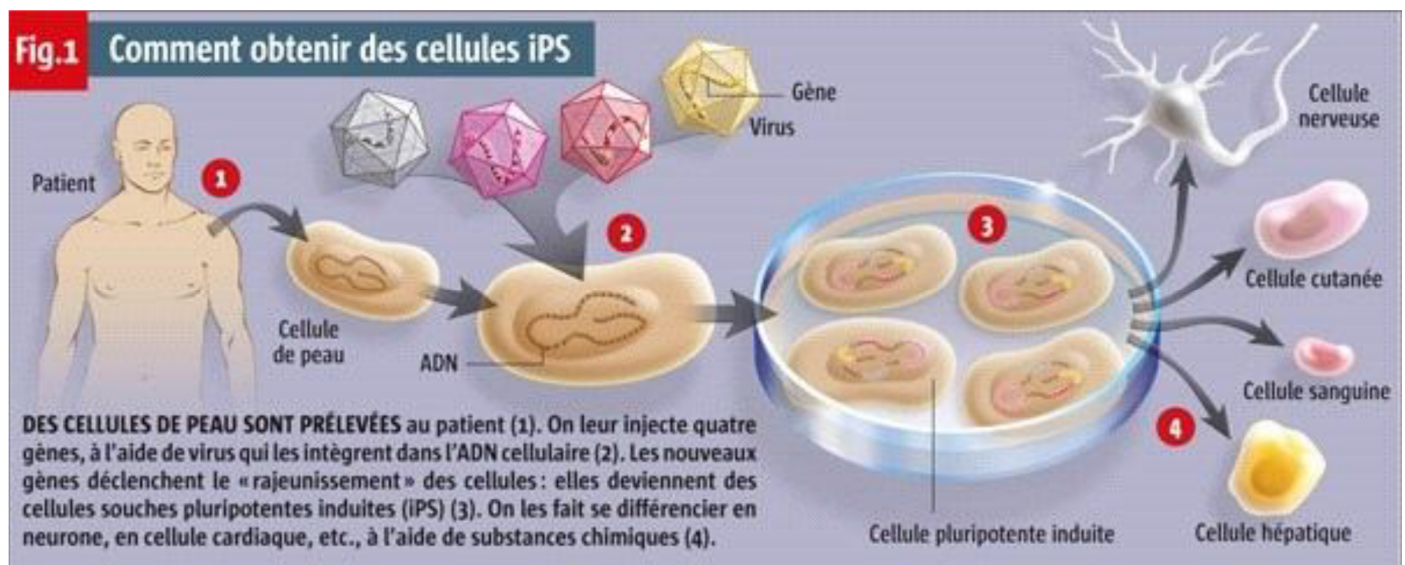


Figure 31: obtention des cellules iPSCs (induced pluripotent cells)

Comme Xeroderma Pigmentosum, l'anémie de Fanconi (FA) est une maladie provoquée par un défaut de réparation de l'ADN. Les patients montrent

une insuffisance médullaire progressive, des anomalies congénitales du développement et l'apparition précoce de cancers, leucémie myéloïde aiguë et carcinomes à cellules squameuses.

La greffe de moelle osseuse est un traitement palliatif pour la leucémie secondaire, mais aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour les patients FA. Dans une étude de 2009, des vecteurs lentiviraux ont été utilisés pour corriger génétiquement des fibroblastes et kératinocytes de patients atteints de l'anémie de Fanconi et induire leur dédifférenciation en cellules souches pluripotentes.

Fait intéressant, les cellules FA non corrigées n'ont pas généré d'iPSC, indiquant l'implication des systèmes de réparation de l'ADN dans la reprogrammation nucléaire. Les iPSCs générés étaient ainsi porteuses du gène FA normal et étaient susceptibles d'être utilisées pour la thérapie génique des patients donneurs, et ce, sans risque de rejet immunologique.

Cette technologie ouvre la voie d'une approche de thérapie génique sûre pour le traitement des troubles de la réparation de l'ADN.

E. Utilisation topique de la T4 endonucléase

Une étude de 1975 montre que le bactériophage T4 endonucléase V est capable de faire une incision en 5' d'une lésion CPD. Le fragment d'ADN résultant de cette coupure est ensuite reconnu et éliminé par une 5'-3' exonucléase laissant un espace comblé par une ADN polymérase. Cette polymérase utilise le simple brin non endommagé comme modèle et une ADN ligase vient ensuite relier le fragment d'ADN néosynthétisé au brin parental.

(119)

Dans les années 80, le laboratoire Yarosh découvrait que la T4 endonucléase V pourrait être amenée dans les cellules en utilisant des liposomes de 200 nm comme véhicules.

Les liposomes anioniques permettent la protection de l'enzyme cationique, et favorisent la pénétration de l'enzyme dans les cellules. En clivant l'ADN au niveau du site de lésions induites par les UV, l'enzyme remplace le défaut de réparation d'ADN des cellules XP. (120)

D'autres travaux du même groupe montrent que ces T4N5 liposomes, dans une lotion hydrogel 1%, lorsqu'ils sont appliqués sur des cultures de fibroblastes, de cellules de peau de sein humain ou de cellules de dos de souris, est capable de délivrer l'enzyme dans les cellules en moins d'une heure, ceci étant presque exclusivement limité à l'épiderme.

Plus tard une corrélation inverse a été montrée par la suite entre la dose de T4N5 et le taux de CPD restant dans l'épiderme. Cette courbe a atteint un plateau (à 0,5 pg/ml), probablement en raison de saturation de la machinerie cellulaire de réparation des lésions après l'incision initiale par l'enzyme T4.

Ces études ont également montré que la plus forte dose T4N5 de liposomes permet la réparation de seulement 50% des lésions CPD mais le taux de mutagenèse était réduit de 99% dans les fibroblastes transformés et de 30% dans les cultures de fibroblastes primaires. Après deux essais cliniques de phase I et trois essais cliniques en phase II chez des patients souffrant de cancer de la peau, les T4N5 liposomes ont finalement été testés chez les patients XP en 2001. (116)

Dans le cadre de ce protocole, les patients appliquaient 4-5 ml de lotion contenant 1 mg/ml d'endonucléase, une fois par jour pendant un an. Hormis le

retrait des lésions lorsque nécessaire, et l'utilisation quotidienne d'écran solaire de 15 SPF ou plus, aucun traitement concomitant n'était autorisé.

Les résultats montrent que le traitement est efficace. Le taux de kératoses actiniques et de carcinomes basocellulaires a été diminué jusqu'à 30% dans le groupe traité contre 68% dans le groupe placebo, en réduisant la promotion et la progression tumorale.

Le traitement était également capable de réduire le taux de certaines molécules immunosuppressives, telles que l'interleukine-10 (IL-10) et le facteur de nécrose tumorale-  (TNF- ). En revanche, malheureusement, le traitement n'a été efficace que chez les patients de moins de 18 ans.

Ceci est probablement du fait que les patients XP plus âgés ont déjà trop de dommages de l'ADN dans leurs cellules qui ne peuvent plus être inversées. (116), (121)

Des essais cliniques sont toujours en cours pour analyser l'application de liposomes T4N5 dans d'autres pathologies et chez les patients immunodéprimés.

III. Ichtyose

L'ichtyose est une dystrophie cutanée congénitale qui correspond à un état particulier de la peau, sèche et couverte de squames fines à bords libres disposées comme des écailles de poissons. Plus ou moins étendue, elle respecte la face, les plis, les paumes des mains et les plantes des pieds. La desquamation est continue. Les personnes qui en sont atteintes ont une transpiration très diminuée.

C'est une anomalie métabolique de la couche cornée, ou une hyperkératose (aussi appelée hyperkératinisation). L'hyperkératose est l'épaississement anormal

de la couche cornée. La peau est sèche et rugueuse, les peaux mortes se détachent presque continuellement.

L'usage de la thérapie génique dans l'ichtyose se résume actuellement au syndrome de Netherton.

Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie cutanée caractérisée par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale (CIE), une anomalie capillaire caractéristique (trichorrh xie invaginata, TI) et des manifestations atopiques.

Le SN est d   à des mutations du gène SPINK5 (5q31-q32) codant l'inhibiteur de protéase à sérine LEKT1. Le déficit en LEKT1 entra  ne une activité hydrolytique augmentée des protéines telle que la trypsine dans la couche cornée (CC) ce qui mène à une desquamation prématurée de la couche cornée et une atteinte sévère de la barrière cutanée.



Figure 32 : Nourrisson présentant un syndrome de Netherton



Figure 33: bébé rouge ou syndrome de Netherton chez un nourrisson

Ceci est dû à un saut d'exon lors des phénomènes d'épissage, une expérience a pu remédier à ceci en utilisant une molécule régulatrice qui reconnaît spécifiquement les exons appelée ExSpe U1 et permet de les exciser correctement

Médiés par un lentivirus, ils ont été testés sur des kératinocytes d'un patient affecté ceci a permis de rétablir l'expression de la protéine.

Ces résultats restent très prometteurs et ouvrent la voix pour son utilisation à grande échelle dans les maladies dues aux sauts d'exons, le principal problème reste le manque de spécificité de cette protéine. (122)



Conclusion

Dès son apparition et notamment son évolution au fil du temps. La thérapie génique est devenue une option sérieuse pour traiter les pathologies congénitales ou acquises incurables par le passé.

Les premiers essais thérapeutiques réussis ont eu lieu au début du 21^{ème} siècle sur 3 enfants atteints de l'immunodéficience sévère liée au chromosome X. Cette première tentative s'est soldée par une réussite et l'obtention de sujets immunocompétents, mais malheureusement 4 ans plus tard 2 des 3 enfants ont développé une leucémie.

Ceci est dû à une insertion du transgène dans une zone tumorigène du génome, la sélection précise du lieu d'insertion, ainsi que le choix d'un vecteur spécifique aux cellules cibles, non toxique, et peu immunogène restent les principaux obstacles à dépasser. Sans oublier le coût éthique de la chose et le coût élevé des recherches.

Le développement des nouvelles techniques, la meilleure sélection des vecteurs, et le contrôle plus précis du site d'insertion des gènes, ainsi que la meilleure connaissance du génome humain grâce à la biologie moléculaire ont fait passer la thérapie génique de la théorie à la réalité.

De nos jours les premiers essais thérapeutiques ont vu le jour notamment dans l'insuffisance surrénalienne, la myopathie de Duchenne, les cancers et le VIH et aussi dans les génodermatoses surtout l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive et l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. Ainsi que plusieurs autres pathologies.

Les progrès récents de la nanotechnologie ont fait passer la thérapie génique du rêve à la réalité ce qui était au début une simple illusion est en train

de se traduire sur le terrain et de se concrétiser, l'humain s'approche à petits pas de la terre promise quoique le chemin reste long et les obstacles s'empilent. L'obstination de l'homme et l'acharnement de la science finira par en venir à bout un jour ou l'autre ou peut-être pas, ceci nous sera révélé dans l'avenir.



Résumé

Titre : les principes de la thérapie génique et son application dans les génodermatoses

Auteur : EL BAKKARI ASAAD

Mots clés : Thérapie génique - génodermatoses- enfant- perspectives du futur

La thérapie génique est une biotechnologie basée sur le transfert de matériel génétique. Elle consiste à utiliser une séquence d'acides nucléiques (le plus souvent un gène, appelé transgène) transporté par un vecteur afin de traiter une maladie ou ses symptômes.

Le développement de nouvelles techniques, une meilleure sélection des vecteurs et un contrôle plus précis du site d'insertion des gènes, ainsi qu'une meilleure connaissance du génome humain, grâce à la biologie moléculaire, ont fait passer la thérapie génique de la théorie à la réalité.

La dermatologie en a largement bénéficié dans la prise en charge des génodermatoses, principalement, les épidermolyses bulleuses, le Xeroderma Pigmentosum et le syndrome de Netherton dans le cadre de l'Ichtyose.

Les avancées actuelles sont déjà très encourageantes et les perspectives d'avenir visent à guérir complètement ces maladies connues, jusqu'à présent, incurables.

Abstract

Title: the principles of gene therapy and its application in genodermatosis

Author: EL BAKKARI ASAAD

Keywords: Gene therapy - génodermatoses- child - future prospects

Gene therapy is a biotechnology based on the transfer of genetic material. It consists in using a nucleic acid sequence (usually a gene, called transgene) carried by a vector in order to treat a disease or its symptoms.

The development of new techniques, a better selection of vectors and more precise control of the site of insertion of genes, as well as knowledge of the human genome, thanks to molecular biology, took the gene therapy from theory to reality.

Dermatology has benefited greatly in the management of genodermatosis mainly epidermolysis bullosa, Xeroderma Pigmentosum and the Netherton syndrome as part of Ichthyosis.

Current advanced are already very encouraging and the outlook aim to completely cure these diseases known so far incurable.

ملخص

العنوان: مبادئ العلاج الجيني وتطبيقاته في الجلديات الوراثية

المؤلف: أسعد البكاري

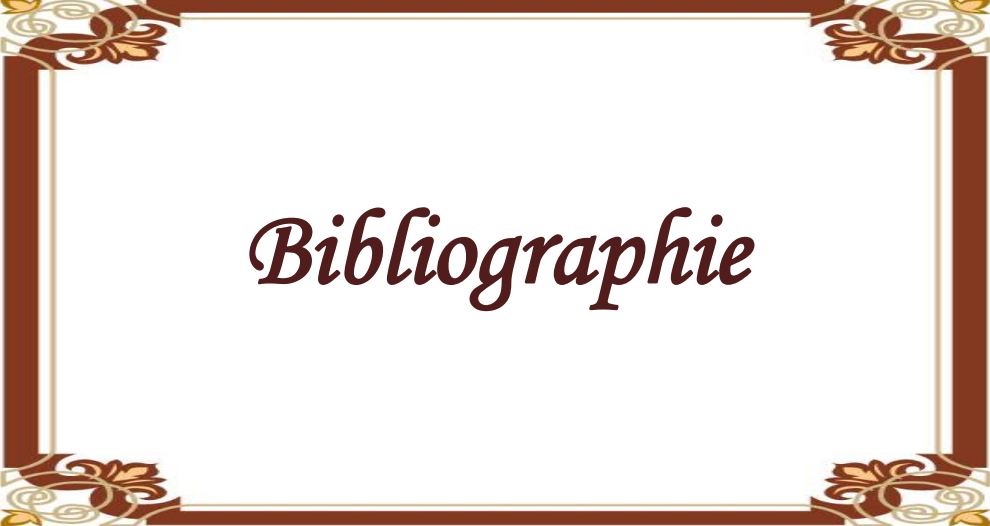
الكلمات الرئيسية: العلاج الجيني - الطفل - الأمراض الجلدية الوراثية -
التطلعات المستقبلية

العلاج الجيني هو تقنية بيولوجية تقوم على نقل الجينات وترتكز على استعمال سلسلة من الأحماض النووية (في غالب الأحيان مورثة) منقولة بوسيط وذلك من أجل معالجة المرض أو أعراضه.

إن تطور التقنيات والاختيار الأفضل للوسيط، وكذلك الضبط الأفضل لموقع الإدراج والمعرفة الجيدة للجينات البشرية بفضل البيولوجيا، كل هذه العوامل قامت بتحويل العلاج الجيني من نظرية إلى علاج واقعي.

الجلديات الوراثية استفادت من هذا العلاج أساسا انحلال الجلد الفقاعي، جفاف الجلد المصطبغ ومتلازمة نيشيرتون.

إن التطورات الحالية مشجعة جدا، أما التطلعات المستقبلية فتسعى إلى معالجة هذه الأمراض بصفة تامة، والمعروفة بأنها أمراض عضال.



Bibliographie

1. **ESCORS D., BRECKPOT K.** *Lentiviral vectors in gene therapy : their current status and future potential*, 58, (2), 107-119. 2010.
2. *Gene therapy for primary immunodeficiencies : looking ahead, towards gene correction*,. **PESSACH I. M., NOTARANGELO L. D.** 2011.
3. *Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human Germline*,. **K.R., SMITH.** 2004, International journal of medical sciences, 1, (2), 76-91.
4. *Gene therapy : regulations, ethics and its practicalities in liver disease.* **JIN X., YANG Y-D., LI Y-M.** 2008, World Journal of Gastroenterology, pp. 14, (15), 2303-2307.
5. *Prospects for the Use of Artificial Chromosomes and Minichromosomes-Like Episomes in Gene Therapy.* **PEREZ-LUZ S., DIAZ-NIDO J.** 2010, Journal of Biomedecine and Biotechnology, pp. 2010, (4), 1-16.
6. **HACKETT C.S and GEURTS A.M., HACKETT P.B.** *Predicting preferential DNA vector insertion sites: implications for functional genomics and gene therapy*, *Genome Biology*, 8, (suppl ment I), 1-17. 2007.
7. **SARGENT R. G., KIM S., GRUENERT D. C.** *Oligo/polynucleotide-based gene modification : strategies and therapeutic potential* 21, (2), 55-75. 2011. pp. 21, (2), 55-75.
8. **al, VALTON J. et.** *Efficient strategies for TALEN-mediated genome editing in mammalian cell lines.* 2014.
9. **al, TAKASU Y. et.** *Efficient TALEN construction for Bombyx mori Gene targeting*,. 2013.

10. **M., HOLKERS.** *Nucleic Acids Research: Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells*, 41, (5), 1-14. 2013.
11. **RICHTER C., CHANG J.T., FINERAN P.C.** *Function and regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) systems*,. 2012.
12. **BONDY-DENOMY J., DAVIDSON A.R.** *To acquire or resist : the complex biological effects of CRISPR-Cas systems*,. 2014.
13. **MALI P. and Al.** *RNA-guided human genome engineering via Cas9*,. 2013.
14. **al, FIRE A. et.** *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**,. 1998.
15. **LIM L.P and Al.** *The microRNAs of *Caenorhabditis elegans**, *Genes & Development*, 17, 991-1008. 2003.
16. **MARQUEZ R.T and McCAFFREY A.P.** *Advances in microRNAs : Implications for gene therapists*, *Human Gene Therapy*, 19, (1), 27-38. 2008.
17. *World Journal of Gastroenterology*, *Harnessing the RNA interference pathway to advance treatment and prevention of hepatocellular carcinoma*. **ARBUTHNOT P, THOMPSON L.J.** 1670-1681, Vol. 14.
18. **CHANG A.L., WOLF J.J., SMOLKE C.D.** *Synthetic RNA switches as a tool for temporal and spatial control over gene expression*,. 2012.

19. **LI Z and RANA T.M.** *Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries,Accounts of chemical research*, 45, (7), 1122-1131. 2012.
20. **B.D., BROWN and al.** *A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice,Blood*, 110, 13, 4144-4153. 2007.
21. *Journal of ophtalmology,Variables and stratégies in development of therapeutic post-transcriptional gene silencing agents,.* **SULLIVAN J.M and Al.** 31, 2011, Vol. 1.
22. **BARAR J and OMIDI Y.** *Translational approaches toward cancer gene therapy : hurdles and hopes,BioImpacts*, 2, (3), 127-143.
23. **LIN.J and Al.** *Stabilization of G-quadruplex DNA by C-5-methyl-cytosine in bcl-2 promoter: Implications for epigenetic regulation,Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433, 368-373. 2012.
24. **GHOSAL G., MUNIYAPPA K.** *Hoogsteen base-pairing revisited : resolving a role in normal biological processes and human diseases,Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, 1-7. 2006.
25. **RODRIGUEZ L and Al.** *Polyurine reverse Hoogsteen hairpins as a gene therapy tool against survivin in human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo,Biochemical Pharmacology*, 86, 1541-1554. 2013.
26. **PAPANIKOLAOU E and Al.** *The New Self-Inactivating Lentiviral Vector for Thalassemia Gene Therapy Combining Two HPFH Activating Elements Corrects Human Thalassemic Hematopoietic Stem Cells,Human Gene Therapy*, 23, 15-31. 2012.

27. **NAYEROSSADAT N and MAEDEH T., ABAS ALI P.** *Viral and nonviral delivery systems for gene therapy*, *Advanced biomedical research*, 1, 3-27. 2012.
28. **NAIDOO J and YOUNG D.** *Gene regulation systems for gene therapy applications in the central nervous system*, *Neurology Research International*, 2012, 1-10. 2012.
29. **K., KAUFMANN, et al.** *Gene therapy on the move*, *EMBO Molecular Medicine*, 5, 1642-1661. 2013.
30. **MANJILA S. B and Al.** *Novel gene delivery systems*, *International Journal of pharmaceutical investigation*, 3, (1), 1-7. 2013.
31. **SHARMA A and LI X., BANGARI D.S., MITTAL S.K.** *Adenovirus receptors and their implications in gene delivery*, *Virus Research*, 143, (2), 184-194. 2009.
32. **COUGHLAN L and Al.** *Tropisme-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors*, *Viruses*, 2, 2290-2355. 2010.
33. **KAMIMURA K., SUDA T. ZHANG G., LIU D.** *Advances in gene delivery systems*, *Pharmaceutical Medecine*, 25, (5), 293-306. 2011.
34. **LENTZ T.B and GRAY S.J., SAMULSKI J.** *Viral vectors for gene delivery to the central nervous system*, *Neurobiology of Disease*, 48, (2), 179-188. 2012.
35. **LI H and Al.** *Assessing the potential for aav vector genotoxicity in a murine model*, *Blood*, 117, (12), 3311-3319. 2011.

36. *Journal of genetic syndromes and gene therapy*, Development of Novel Recombinant AAV Vectors and Strategies for the Potential Gene Therapy of Hemophilia,. **ZHONG L. and Al.** 1-16, Vol. 10.
37. **BOUTIN S and Al.** Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population implications for gene therapy using AAV vectors, *Human Gene Therapy*, 21, (6), 704-712. 2010.
38. **SEN D and Al.** Improved adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors for gene therapy, *Scientific Reports*, 3, 1832-1838. 2013.
39. **SPENCER T.E and PALMARINI M.** Application of next generation sequencing in mammalian embryogenomics: Lessons learned from endogenous betaretroviruses of sheep, *Animal Reproduction Science*, 134, 95-103. 2012.
40. **CRONIN J., ZHANG X.-Y. REISER J.** Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping, *Current Gene Therapy*, 5, (4), 387-398. 2005.
41. **DUFAIT I., et al.** Retroviral and lentiviral vectors for the induction of immunological tolerance, *Scientifica*, 2012, 1-14. 2012.
42. **J.J., GREEN.** Nanoparticules for intracellular nucleic acid delivery, *Annals of Biomedical Engineering*, 40, (7), 1408-1418. 2012.
43. *Non viral gene delivery : principles, limitations and recent progress*., **AL-DOSARI M. S., GAO X.** 2009, American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, pp. 11, (4), 671-681.

44. **KONG F, et al.** *Mannosylated liposomes for targeted gene delivery*, *International Journal of Nanomedecine*, 7, 1079-1089. 2012.
45. **SARKER S and Al.** *Arginine-based cationic liposomes for efficient in vitro plasmid DNA delivery with low cytotoxicity*, *International Journal of Nanomedecine*, 8, 1361-1375. 2013.
46. **MIELE E and Al.** *Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy*, *International Journal of Nanomedecine*, 7, 3637-3657. 2012.
47. *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery*, *Journal of Controlled Release*. **LV H and ZHANG S., WANG B., CUI S., YAN J.** 100-109, 2006, Vol. 114 .
48. **LEE Y and Al.** *Human Erythropoietin Gene Delivery Using an Arginine-grafted Bioreducible Polymer System?* *Molecular therapy*, 20, (7), 1360-1366. 2012.
49. **XU J and FENG E., SONG J.** *Renaissance of aliphatic polycarbonates : New techniques and biomedical applications*, *Journal of Applied Polymer Science*, 131, (5), 1-16. 2014.
50. **MAO S and SUN W., KISSEL T.** *Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 12-27. 2009.
51. *Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems : reviewing three decades of research*,. **ELZOGHBY, A.O.** *Journal of Controlled Release* ,172, 1075-1091.

52. **HUANG Y and Al.** *Delivery of small interfering RNAs in human cervical cancer cells by polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes*, *Nanoscale Research Letters*, 8, 267-278. 2013.
53. **BATES K., KOSTARELOS K.** *Carbon nanotubes as vectors for gene therapy : past achievements, present challenges and future goals*,. 2013.
54. **NAM H.Y and Al.** *Biodegradable PANAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity*, *Biomaterials*, 30, 665-673. 2009.
55. **CAO B., QIU P., MAO C.** *Mesoporous Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Polyacrylic Acid Etching and Their Application in Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells*,. 2013.
56. **PISSUWAN D and NIIDOME T., CORTIE M.B.** *The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems*, *Journal of Controlled Release*, 149, 65-71. 2011.
57. **LADEWIG K., et al.** *Efficient si RNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles*, *Biomaterials*, 31, 1821-1829. 2010.
58. *Journal of Controlled Release*, *High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA*,. **YAN S and Al.** 763-771, 2012, Vol. 161.
59. **WOLFF J.A. and BUDKER V.** *The mechanism of naked DNA uptake and expression*, *Advances in Genetics*, 54, 1-20. 2005.
60. **BONAMASSA B., HAI L., LIU D.** *Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research*,. 2011.

61. **CUKJATI D., BATIUSKAITE D ANDRE F., MIKLAV I  D.** *Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy*, *Bioelectrochemistry*, 70, 501-507.
62. **GRESCH O. , et al.** *New non-viral method for gene transfer into primary cells*, *Methods*, 33, 151-163. 2004.
63. **LENTACKER I. and DE COCK I., DECKERS R., DE SMEDT S.C.** *Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms*, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013.
64. **LI C and LI L., KEATES A.C.** *Targetting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles*, *Oncotarget*, 3, (4), 365-370. 2012.
65. **ZHENG and Al.** *Preparation and characterization of magnetic gene vectors for targeting gene delivery*, *Applied Surface Science*, 259, 201-207.
66. **C.&Al, WANG.** *Dual-purpose magnetic micelles for MRI and gene delivery*, *Journal of Controlled Release*, 163, 82-92. 2012.
67. **MANSELL H and Al.** *Site directed vascular gene delivery in vivo by ultrasonic destruction of magnetic nanoparticle coated microbubbles*, *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medecine*, 8, 1309-1318. 2012.
68. **PLANK C and ZELPHATI O., MYKHAYLYK O.** *Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 1300-1331. 2011.
69. *Journal of Biomedical Science*, *DNA transposon-based gene vehicles - scenes from a evolutionary drive*,. **SKIPPER A.A. and ANDERSEN P.R., SHARMA N., MIKKELSEN .** 92-113, 2013, Vol. 20.

70. **JUNG S. , et al.** *Sleeping Beauty transposon system harboring HRAS, c-Myc and shp53 induces sarcomatoid carcinomas in mouse skin, Oncology Reports, 29, 1293-1298.*
71. **FIELD A-C. , et al.** *Comparison of lentiviral dans Sleeping Beauty mediated ab T cell receptor gene transfer,Plos One, 8, (6), 1-9. 2013.*
72. **NI X and CASTANARES M., MUKHERJEE A., LUPOLD S.E.** *Nucleic acid aptamers : clinical applications and promising new horizons,Current Medicinal Chemistry, 18, (27), 4206-4214. 2011.*
73. **KOTULA J. and W. et al.** *Aptamer-mediated delivery of splice-switching oligonucleotides to nuclei of cancer cells,Nucleic Acid Therapeutics, 22, (3), 187-195. 2012.*
74. *Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. Nat Med.* **Woodley DT, Keene DR, Atha T, Huang Y, Lipman K, Li W, Chen M.** 693–695, 2004, Vol. 10.
75. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB): Etiology, Diagnosis, Multidisciplinary Care and Therapy, Vienna, Springer.* **Fine JD, Hintner H.** 978–3-211–79271-1, s.l. : ISBN, 2009.
76. *The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product. J Invest Dermatol.* **Sawamura D and Yasukawa K, Kodama K, et al.** 967–71, 2002, Vol. 118.
77. *A microinjected COL7A1-PAC vector restores synthesis of intact procollagen VII in a dystrophic epidermolysis bullosa keratinocyte cell*

- line. Hum Gene Ther.* **Mecklenbeck S and Compton SH, Mejia JE, et al.** 1655–62, 2002, Vol. 13.
78. *Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen ‘‘minigene’’. Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. J Biol Chem.* **Chen M , et al.** 24429–35, 2000, Vol. 275.
79. **Sebastiano V and Zhen HH, Haddad B, et al.** *Human COL7A1- corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Sci Transl Med.* 2014. 6: 264ra163.
80. *Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. J Invest Dermatol.* **Woodley DT and Krueger GG, Jorgensen CM, et al.** 1021–8, 2003, Vol. 121.
81. *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. Science.* **Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM.** 1749–51, 2003, Vol. 300.
82. *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science.* **Hacein-Bey-Abina S and Von Kalle C, Schmidt M, et al.** 415–9, 2003, Vol. 302.
83. *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest.* **Hacein-Bey-Abina and Garrigue A, Wang GP, et al.** 3132–42, 2008, Vol. 118.
84. *Gene therapy of x-linked adrenoleukodystrophy using hematopoietic stem cells and a lentiviral vector. Bull Acad Natl Med 2010.* **N, Cartier and**

- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, et al.** 255–64 DISCUSSION 64-8, 2010, Vol. 194.
85. *Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. Science. A, Biffi and Montini E, Lorioli L, et al.* 1233158, 2013, Vol. 341.
86. *In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. Proc Natl Acad Sci U S A. Robbins PB and Lin Q, Goodnough JB, Tian H, Chen X, Khavari PA.* 5193–8, 2001, Vol. 98.
87. **S, Ortiz-Urda and Lin Q, Green CL et al.** Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin. *J Clin Invest.* 2003. Vol. 111, 251–5.
88. *Human gene therapy. Nature . WF, Anderson.* 25–30, 1998, Vol. 392(6679 suppl).
89. *The death of Jesse Gelsinger: new evidence of the influence of money and prestige in human research. Am J Law Med. Wilson RF.* 295–325, 2010, Vol. 36.
90. *Adeno-associated virus vector integration. Curr Opin Mol Ther. Deyle DR, Russell DW.* 442–7, 2009, Vol. 11.
91. *Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. Mol Cell Biol. Taghian DG, Nickoloff JA.* 6386, 1997, Vol. 17.
92. *Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse*

- embryonic stem cells. Mol Cell Biol.* **G, Donoho, M, Jasin and P, Berg.** 4070–8, 1998, Vol. 18.
93. *Targeting DNA doublestrand breaks with TAL effector nucleases. Genetics.* **M, Christian, et al.** 757–61, 2010, Vol. 186.
94. *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res 2011.* **T, Cermak, et al.** e82, 2011, Vol. 39.
95. *Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol.* **Tolar J and Xia L, Riddle MJ, et al.** 848–56, 2011, Vol. 131.
96. *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science.* **Jinek M, et al.** 816–21, 2012, Vol. 337.
97. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science.* **L, Cong, et al.** 819–23, 2013, Vol. 339.
98. **Dermatology, Journal of Investigative.** 2015. Vol. 135, 1705–1707. doi:10.1038/jid.2015.149.
99. *An unbiased genomewide analysis of zinc-finger nuclease specificity, Nat Biotechnol.* **Gabriel R and Lombardo A, Arens A, et al.** 816–23, 2011, Vol. 29.
100. *Efficient gene disruption in diverse strains of Toxoplasma gondii using CRISPR/CAS9. MBio.* **B, Shen, et al.** e01114-14, 2014, Vol. 5.
101. *TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. Mol Ther.* **Osborn MJ and Starker CG, McElroy AN, et al.** 1151–9, 2013, Vol. 21.

102. *Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. Hum Gene Ther.* **MJ, Osborn, et al.** 114–26, 2015, Vol. 26.
103. *GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat Biotechnol.* **SQ, Tsai, et al.** 187–97, 2015, Vol. 33.
104. *Human gene targeting by Adeno-Associated virus vectors are enhanced by DNA doublestrand breaks. Mol Cell Biol.* **Miller DG, LM, Petek and DW, Russell.** 3550–7, 2003, Vol. 23.
105. *Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. Sci Transl Med.* **Umegaki-Arao N and Pasmooij AM, Itoh M, et al.** 264ra164, 2014, Vol. 6.
106. *Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol.* **J, Tolar, et al.** 1246–54, 2014, Vol. 134.
107. *Successful therapeutic transplantation of revertant skin in epidermolysis bullosa. J Am Acad Dermatol.* **A, Gostynski, AM, Pasmooij and MF, Jonkman.** 98–101, 2014, Vol. 70.
108. *Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol.* **Goto M and Sawamura D, Ito K, et al.** 766-72, 2006, Vol. 126.
109. *Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. Nature.* **P, Genovese and al, Schioli G: Escobar G et.** 235–40, 2014, Vol. 510.

110. **Mavilio F, et al.** Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med.* 2006. Vol. 12, 1397–1402.
111. **Nakano A, Chao SC, Pulkkinen L, Murrell D, Bruckner-Tuderman L, Pfendner E, Uitto J.** Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet.* s.l. : 41–51, 2002. Vol. 110.
112. **De Rosa L, Carulli S, Cocchiarella F, Quaglino D, Enzo E, Franchini E, Giannetti A, De Santis G, Recchia A, Pellegrini G, De Luca M.** Long-term stability and safety of transgenic cultured epidermal stem cells in gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Stem Cell Rep.* 2014. Vol. 2, 1–8.
113. **Almaani N, Nagy N, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Lai-Cheong JE, Clements SE, Techanukul T, Tanaka A, Mellerio JE, McGrath JA.** Revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2010. Vol. 130, 1937–1940.
114. **Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, Owaribe K, Pulkkinen L, Uitto J.** Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell.* 1997. Vol. 88, 543–551.
115. *Adhesive stripping to remove epidermis in junctional epidermolysis bullosa for revertant cell therapy. Br j dermatol .* **Gostyinski A, Devianne FC, Pasmooij AM, Pas HH, Jonkman MF.** 444-447, 2009, Vol. 161.

116. **L. Zakraoui, R. Gharbi.** Trouble de la minéralisation osseuse au cours Du Xeroderma Pigmentosum ; La presse médicale. 29 août- 5 septembre 1987. Vol. 16, 28.
117. **S.Ottaviana, A. Forestb, P. Dieudéa, B. Crickxb, O. Meyera.** Ostéosarcome chez un patient ayant une Xeroderma Pigmentosum : 1er cas rapporté : Revue du rhumatisme; Larson DM, Cunningham BB. Photodynamic therapy in a teenage girl with Xeroderma Pigmentosum type C. Pediatric Dermatol. May- Jun 2012. 2006-2012. Vol. 73; 29, 373-4.
118. **Christiane Kuschal, Sikandar G. Khan, Benedikt Enk and John J. DiGiovanna and Kenneth H. Kr.** *Read-through of stop codons by use of aminoglycosides in cells from Xeroderma Pigmentosum group C patients, Dermatology Branch, NCI, Bethesda, MD USA.* 2015.
119. **Ayako Muto, Akira Matsui, Yoshiaki Saito Hiroko Iwamoto, Kaori Kaneko, Kaori Masuko, Yuri Chikumaru, Kazuyo Saito and Seiji Kimura.** Laryngeal dystonia in Xeroderma Pigmentosum: Brain and Development. 2005. Vol. 27, 8-598-601.
120. **K, A Rai D.** Rekha giant cell tumour of the tibia with XERODERMA PIGMENTOSUM. Journal of Clinical and Diagnostic Research. december 2007 : s.n. Vol. 1, 529-532.
121. **O. Boudghene, Stambouli, A. Belbachir.** *Xeroderma Pigmentosum et Manifestations osseuses ; Annales de dermatologie et de vénéréologie vol. 130, 2S53-2S167.* 2003.

122. *Exon-Specific UIs Correct SPINK5 Exon 11 Skipping Caused by a Synonymous Substitution that Affects a Bifunctional Splicing Regulatory Element.* **Andrea Dal Mas, et al.** 2015.
123. **BONDY-DENOMY J., DAVIDSON A.R.** *To acquire or resist : the complex biological effects of CRISPR-Cas systems,.* 2014.
124. **al., CAO X. et.** *Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency,.* 2011.
125. **al, CHANG C. et.** *Structural Diversity Repertoire of Gene Silencing Small Interfering RNAs,.* 2011.
126. **<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.** *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (page consultée en août 2014),.*
127. **HERWEIJER H., , WOLFF J.A.** *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy, Gene Therapy, 10, 453-458.* 2003.
128. *Gene therapy : regulations, ethics and its practicalities in liver disease,.* **JIN X., YANG Y-D., LI Y-M.** *World Journal of Gastroenterology*, pp. 14, (15), 2303-2307.
129. **MANDEVILLE J-S and , BOURASSA P., THOMAS T.J.,TAJMIR-RIahi H-A.** *Biogenic and synthetic polyamines bind cationic dendrimers, Plos One, 7, (4).* 2012.
130. *Human Molecular Genetics, Trieste, Italy; 2Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI)-IRCCS. Italy.*
131. *Exon-Specific UIs Correct SPINK5 Exon 11 Skipping Caused by a Synonymous Substitution that Affects a Bifunctional Splicing Regulatory*

- Element. Andrea Dal Mas et al 2015 International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB),,. Andrea dal, Mas and al. 2015.*
132. *J Clin Invest: Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue.* Ortiz-Urda S, Lin Q, Green CL, Keene DR, Marinkovich MP and Khavari PA. 251–5, 2005, Vol. 111.
133. *Fibroblasts and dermal gene therapy: a mini review. Hum Gene Therapy.* GG, Krueger. 2289–96, 2000, Vol. 11.
134. Baldeschi C and Gache Y, Rattenholl A, et al. *Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. Hum Mol Genet 12:1897–905. 2003.*
135. S, Ortiz-Urda and Thyagarajan B, Keene DR, et al. *Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. Nat Med 8: 1166–70. 2002.*
136. *Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. Nat Genet.* Chen M and Kasahara N, Keene DR, et al. 670–5, 2002, Vol. 32.
137. *Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. Mol Ther.* Woodley DT and Keene DR, Atha T, et al. 318–26, 2004, Vol. 10.
138. *Rapid “opensource” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. Mol Cell.* ML, Maeder, et al. 294–301, 2008, Vol. 31.

139. *Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. Mol Ther.* MH, Porteus. 438–46, 2006, Vol. 13.
140. *Gene targeting using zinc finger nucleases. Nat Biotechnol.* MH, Porteus and D, Carroll. 967–73, 2005, Vol. 23.
141. *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease, Nature.* Anders C, et al. 569–73, 2014, Vol. 513.
142. *Plant science. DNA binding made easy? Science.* Voytas DF and Joung JK. 1491–2, 2009, Vol. 326.
143. *CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial offtarget activity, Nucleic Acids Res.* TJ, Cradick, et al. 9584–92, 2013, Vol. 41.
144. Fine JD and Bruckner-Tuderman L, Eady RA et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol.* 2014. Vol. 70, 1103–26.
145. Fine JD and Hintner H. Life with Epidermolysis Bullosa (EB): Etiology, Diagnosis, Multidisciplinary Care and Therapy. Vienna : ISBN, 2009. ISBN 978–3-211–79271-1.
146. Eva M. Murauer, Ulrich Koller, Graziella Pellegrini, Michele De Luca and Johann W. Bauer. *Advances in Gene/Cell Therapy in Epidermolysis Bullosa.* Laboratory for Epidermolysis Bullosa Research, EB House Austria, University Hospital of Dermatology, Paracelsus Medical University Salzburg, Salzburg, Austria Center for Regenerative Medicine “Stefano Ferrari,” Department of Life Sciences : s.n., 6 June 2015.

147. DEGOS, Robert. *Dermatologie : les complications de XP.720g Flammarion medicine-science.*
148. Carolina Quayle, Carlos Frederico Martins Menck and Keronninn Moreno Lima-Bessa. *Recombinant Viral Vectors for Investigating DNA Damage Responses and Gene Therapy of Xeroderma Pigmentosum. DNA Repair and Human Health, Dr. Sonya Vengrova (Ed.). [www.intechopen.com] 2011.*
149. *XPC initiation codon mutation in Xeroderma Pigmentosum patients with and without neurological symptoms. DNA repair.* col, Sikandar G. Khan et. 114–125, 2009 : s.n., Vol. 8.
150. *Molecular genetics of the cutaneous basement Membrane zone. Perspectives on epidermolysis bullosa and other blistering skin diseases. J Clin Invest.* Uitto J, Christiano AM. 687–692, 1992, Vol. 90.
151. *Intravenously injected recombinant human type VII collagen homes to skin wounds and restores skin integrity of dystrophic epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol.* Woodley DT, Wang X, Amir M, Hwang B, Remington J, Hou Y, Uitto J, Keene D, Chen M. 1910–1913, 2013, Vol. 133.
152. *Functional correction of type VII collagen expression in dystrophic epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol .* Murauer EM, Gache Y, Gratz IK, Klausegger A, Muss W, Gruber C, Meneguzzi G, Hintner H, Bauer JW. 74–83, 2011, Vol. 131.
153. *Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. Mol Ther.* Melo SP, Lisowski L,

Bashkirova E, Zhen HH, Chu K, Keene DR, Marinkovich MP, Kay MA, Oro AE. 725–733, 2014, Vol. 22.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقراط

بسم الله الرحمان الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- أنا أكرس حياتي لخدمة الإنسانية.
 - وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه.
 - وأن أمارس مهنتي بوانع من ضميري وشر في جاعلا صحة مريض هدي في الأول.
 - وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي.
 - وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب.
 - وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي.
 - وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي.
 - وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها.
 - وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد.
 - بكل هذا أتعهد عن كامل اختياري ومقسما بشري في.
- والله على ما أقول شهيد .

مبادئ العلاج الجيني وتطبيقاته في الجلديات الوراثية

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرف

السيد : أسعد البكاري

المزاد في : 05 أكتوبر 1990 بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: العلاج الجيني - الجلديات الوراثية - الطفل - التطلمات المستقبلية.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد : عبد العالي بنتهيلا

أستاذ في طب الأطفال

السيدة : فاطمة جابويريك

أستاذة في طب الأطفال

السيدة : سكيمة الحمزاوي

أستاذة في علم الأحياء الدقيقة

السيدة : زكية البرنوصي

أستاذة في علم التشريح الدقيق