

Le CRISPR-CAS9 pour prévenir et contrôler le glaucome causé par les mutations du gène *MYOC*

Ce travail de recherche relate les dernières expériences *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* utilisant le *CRISPR-CAS9* pour réduire la quantité de myocillines mutées s'accumulant dans les cellules du treillis trabéculaire. Réduire l'accumulation par ce moyen diminue vraisemblablement le stress cellulaire et les apoptoses qui en découlent. Cela permet un écoulement amélioré de l'humeur aqueuse à travers le treillis trabéculaire et, de ce fait, réduit la pression intraoculaire. Thérapeutiquement, cela peut avoir une double utilité : prévenir ou contrôler un glaucome à angle ouvert, lequel, dans ce cas précis, peut être juvénile ou adulte.

Note :

CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CAS9 = CRISPR Associated Protein 9

Le CRISPR-CAS9 pour prévenir et contrôler le glaucome

Dans l'ADN des procaryotes, les séquences CRISPRⁱ servent à contenir, à la suite d'une première infection à bactériophages ou à virus, des fragments de l'ADN de ces derniers. Aussi, ces séquences CRISPR collaborent avec une endonucléase, la CAS9ⁱⁱ.

S'il y a une seconde invasion des mêmes bactériophages ou virus, l'ADN ayant été collecté est transcrit en ARN qui va agir comme guide à la CAS9 afin de cliver le matériel génétique de l'envahisseur récidivant¹. Il s'agit d'un processus important de l'immunité adaptative des bactéries et qui, ayant été le fruit de recherches, est maintenant utilisé comme outil de modifications génomiques. Par exemple, le système CRISPR-CAS9 de type II utilise un guide ARN unique, synthétisé en fonction du gène cible. Cet ARN guide va se lier au brin de l'ADN génomique lui correspondant et permet à la CAS9 l'accompagnement de cliver la double hélice¹. Ce nouvel outil permet d'espérer des progrès dans le traitement des maladies causées par des altérations génétiques¹⁻²⁻³, comme l'est par exemple le glaucome primaire à angle ouvert, ou GPAO, associé aux mutations du gène MYOC. Des expériences *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* rapportées dans le PNASⁱⁱⁱ du 17 octobre 2017³ suggèrent en effet qu'un système CRISPR-CAS9, utilisé pour réduire au silence le gène MYOC, permettrait peut-être de prévenir et de contrôler efficacement ce type de glaucome.

Le glaucome est une maladie primaire à l'étiologie nébuleuse se caractérisant par la dégénérescence de la tête du nerf optique ainsi que par une perte de champ visuel; son principal facteur de risque est une hausse de la pression intraoculaire, ou PIO³⁻⁴⁻⁵⁻⁶.

En plus de cette dernière, le GPAO (nommé « ouvert » puisqu'il concerne un œil glaucomeux dont l'angle iridocornéen permet toujours l'écoulement de l'humeur aqueuse par le treillis trabéculaire) a pour facteurs de risque des causes environnementales ainsi qu'une histoire familiale de glaucome⁴. Sachant que, dans les chromosomes, une vingtaine de loci ont été identifiés comme contribuant au GPAO⁵⁻⁶, il n'est pas étonnant d'apprendre que 90% des cas seraient en effet causés par des interactions polygéniques et des effets environnementaux. Le 10% restant ne serait causé que par l'effet de gènes indépendants subissant des mutations⁵⁻⁶, dont un exemple est celui du gène MYOC. Ce dernier permet la production de la myocilline, dont les mutations causent 4% des cas de GPAO³. Ces cas sont parfois juvéniles, parfois adultes, et la transmission est autosomique dominante³⁻⁴.

Le rôle exact de la myocilline de type sauvage, laquelle est notamment sécrétée, au niveau de l'œil, par les cellules du treillis trabéculaire, est inconnu³⁻⁴ et ne semble pas être important dans la santé oculaire³. Cette myocilline sauvage sort de la cellule pour aller dans l'humeur aqueuse. Ce n'est pas le cas de la forme mutée. En effet, la mutation empêche la protéine de se replier, provoquant son accumulation par agrégation au niveau du réticulum endoplasmique et induisant ainsi un stress à la cellule. Afin de se protéger, celle-ci engendre la cascade UPR (*unfolded protein response*) qui consiste à réduire la traduction protéique et à augmenter le nombre de protéines chaperons afin de promouvoir le bon assemblage de la myocilline – mais si le taux de mutation est trop élevé, cela ne suffit pas et la cascade UPR cause l'apoptose³⁻⁴. Le treillis trabéculaire ayant pour fonction le bon écoulement de l'humeur aqueuse vers le canal de Schlemm, une accumulation de déchets cellulaires en son sein lui nuit certainement : l'humeur aqueuse s'accumule dans l'œil, et la pression intraoculaire augmente³⁻⁴.

La pression intraoculaire trop élevée est le seul facteur de risque du développement et de la progression du GPAO qu'il est possible de modifier⁵. On peut supposer que toute thérapie, même génique, qui vise à terme une réduction de la PIO, peut aider à prévenir ou à empêcher l'évolution d'un GPAO. Les expériences récentes dont il a été question un peu plus haut, mettant en scène le CRISPR-CAS9, vont dans ce sens : en utilisant la CAS9 afin de cliver le gène MYOC, la production aberrante de myocilline mutée s'arrête. Différentes expériences sur des souris et sur des yeux humains, *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* ont été menées afin de prouver que, en clivant ainsi le gène MYOC, le stress au réticulum endoplasmique, la PIO et les dommages causés par le glaucome (si l'œil est déjà glaucomeux) sont tous diminués³.

Les expériences mettent en scène deux adénovirus, Ad5-CAS9 et Ad5-crMYOC. Le premier ne contient que CAS9, alors que le deuxième contient en plus un ARN guide, crMYOC, qui mène l'endonucléase au premier exon du gène MYOC afin d'introduire, par le clivage et le processus de réparation endogène en découlant, une mutation frameshift visant à empêcher le développement de la protéine³.

La première expérience, *in vitro*, a porté sur l'incorporation des deux adénovirus à des cellules de treillis trabéculaire naïves et à des cellules ayant subi une transfection d'acides nucléiques leur permettant de produire en grande quantité de la myocilline de phénotype sauvage et muté. Le type sauvage s'accumule bien sûr dans le milieu de culture, et le type mutant, dans la cellule. Cette accumulation augmente la concentration d'autres protéines intracellulaires : BiP, Calnexin, PDI, ATF4 et CHOP (qui sont toutes des facteurs de la cascade UPR mentionnée plus tôt). Alors que Ad5-CAS9 n'a d'effet sur aucun des groupes cellulaires, Ad5-crMYOC a, selon des résultats recueillis notamment par analyse densitométrique, réduit la concentration en myocilline associée à tous les types de cellules, en plus de baisser la concentration des facteurs de la cascade UPR dans les cellules produisant le type mutant. Ad5-crMYOC semble donc avoir eu les effets qui, dans un œil, auraient réduit la PIO. Cette expérience *in vitro* révèle principalement que le crMYOC fonctionne comme ARN guide spécifique au gène MYOC afin d'orienter la CAS9³.

Dans le cadre de la seconde expérience, cette fois-ci *in vivo*, les chercheurs ont, par transgénèse, incorporé le gène humain MYOC provoquant des mutations à des souris. Ainsi, celles-ci, après quelques mois, ont souffert d'une pression intraoculaire élevée, d'atteintes aux cellules ganglionnaires de la rétine et d'une dégénérescence axonale du nerf optique; en d'autres termes, elles ont eu un GPAO. Les effets d'une injection intravitreuse d'adénovirus Ad5-crMYOC ont été mesurés dans différents cas. Ces résultats sont toujours comparés à ceux d'un groupe contrôle ayant reçu Ad5-CAS9, celui-ci ne devant théoriquement pas avoir d'effet. Le premier cas est celui de souris jeunes (moins d'un mois). On a observé après deux mois que la PIO du groupe contrôle a augmenté (plus de 20 mm Hg), alors que celle des yeux contenant Ad5-crMYOC a stagné autour de 16 mm Hg. Il semblerait donc que crMYOC ait fonctionné en réduisant la quantité de myocilline mutante, empêchant de ce fait une hausse de la PIO. Le deuxième cas est celui de souris âgées (plus de 9 mois) ayant déjà une PIO élevée. Deux semaines après l'injection d'Ad5-crMYOC, on a observé une baisse de la PIO (versus une hausse pour celle du groupe contrôle). Deux mois plus tard, la tendance est la même : une PIO plus faible dans le groupe au génome modifié.


Il faut saisir ici que la PIO baisse parce que le treillis trabéculaire subit un stress moins important et permet un meilleur écoulement. Peut-on conclure que le fait de baisser la quantité de myocilline mutante intracellulaire ramène le treillis trabéculaire à la normale? C'est du moins ce que les chercheurs suggèrent en injectant, dans un troisième cas, Ad5-crMYOC à des souris ayant environ 4 mois de vie et en mesurant l'écoulement, par le treillis, de l'humeur aqueuse. Ils ont alors remarqué, par rapport au groupe contrôle, une amélioration en moyenne de l'écoulement. Par le deuxième cas (baisse de la PIO) et le troisième cas (hausse de l'écoulement), les chercheurs suggèrent qu'il existe des groupes de cellules aux capacités prolifératives exceptionnelles dans le treillis trabéculaire qui, malgré le stress causé par la forte concentration protéique, savent conserver leur viabilité et, si le stress diminue, peuvent à nouveau user de leurs capacités pour régénérer le treillis. Finalement, un quatrième cas a montré, chez des souris de 4 mois, une amélioration de la fonction des cellules ganglionnaires de la rétine en injectant Ad5-crMYOC. Cela est une amélioration qui protège d'un éventuel GPAO.

On peut certes se questionner sur l'éventuelle efficacité chez l'humain. Bien que le gène humain MYOC ait été ajouté au génome de la souris, rien ne prouve qu'il n'y ait pas un facteur aidant chez elle qui permet à Ad5-crMYOC de faire son travail. Les chercheurs, afin d'évaluer la faisabilité chez l'homme, ont donc conçu un modèle *ex vivo*, c'est-à-dire un modèle qui utilise des tissus humains. Pour ce faire, ils ont recueilli les segments antérieurs de paires d'yeux humains, ont injecté Ad5-crMYOC dans un œil et Ad5-CAS9 dans l'autre, et les ont placés dans un milieu perfusé³⁻⁷. Le résultat est une diminution d'ARNm de la myocilline et une baisse de sa concentration dans le milieu de culture, seulement du côté de l'œil ayant Ad5-crMYOC³. Bien que ces résultats encourageants suggèrent que la thérapie génique fonctionnerait *in vivo* chez l'humain, on peut, encore, garder quelques réserves. Un des avantages d'un modèle *ex vivo* est que le mécanisme à l'étude ne peut être affecté par des altérations biologiques extérieures à l'organe étudié⁷, mais dans le cas présent, il n'est pas impossible que, justement, un facteur biologique dont l'origine n'est pas le segment antérieur de l'œil affecte les résultats d'un essai *in vivo* chez l'humain.

En résumé, l'expérience *in vitro* illustre d'abord l'efficacité de crMYOC pour guider CAS9. L'expérience *in vivo* démontre ensuite l'efficacité de celle-ci sur le gène MYOC humain introduit dans une souris. Elle permet de réduire les symptômes de GPAO en baissant la PIO chez les souris âgées et contient la PIO chez les plus jeunes. L'expérience permet aussi l'hypothèse que des cellules du treillis trabéculaire ont d'incroyables capacités prolifératives enclenchées après un fort stress. Finalement, l'expérience *ex vivo* pose un modèle suggérant la faisabilité *in vivo* dans l'œil humain.

Tout cela est prometteur : CRISPR-CAS9 fonctionne dans ces contextes. Il faut cependant garder en tête que des obstacles, notamment en lien avec son mode d'incorporation dans les cellules *in vivo*, se tiennent sur sa route². Les chercheurs ayant mené ces expériences ont justement rapporté que l'incorporation des adénovirus dans les yeux des souris ont occasionné de légères inflammations³ – il est difficile de dire ce qu'auraient été ces inflammations dans les yeux humains et si elles auraient affecté les résultats. Autrement dit, il est intéressant de se questionner sur les éventuels méfaits d'arrêter la production de myocilline, sa fonction n'étant pas encore comprise. Elle se retrouve dans d'autres organes, comme par exemple le cœur et le cerveau³. Ce fait laisse supposer qu'elle puisse avoir, malgré les apparences, un rôle important à jouer.

Il est important de rappeler, en conclusion, que le GPAO lié à la myocilline ne touche qu'une petite partie de la population glaucomateuse (tous types confondus).

Heureusement, les avancées sont sur tous les fronts. Par exemple, certaines recherches sont en cours au sujet d'une possible troisième voie d'évacuation de l'humeur aqueuse : une voie uvéolymphatique, laquelle utiliserait des vaisseaux lymphatiques découverts dans le corps ciliaire⁸. Cette troisième voie s'ajouterait donc à la voie typique (empruntant le treillis trabéculaire vers le canal de Schlemm) et à la voie atypique uvéosclérale (évacuation par le muscle ciliaire et la sclère). Si une approche thérapeutique utilisant cette nouvelle voie était possible et qu'elle était efficace pour réduire la PIO, il s'agirait d'un traitement prometteur pour la prévention des glaucomes en général⁸. 

BIBLIOGRAPHIE

1. Kim EJ, Kang KH, Ju JH. CRISPR-Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med.* 2017 Jan;32(1):42-61. doi:10.3904/kjim.2016.198. Epub 2017 Jan 1. Review. PubMed PMID: 28049282; PubMedCentral PMCID: PMC5214730.
2. Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjug Chem.* 2017 Apr 19;28(4):880-884. doi: 10.1021/acs.bioconjugchem.7b00057. Epub 2017 Mar 17. Review. PubMed PMID: 28263568.
3. Jain A, Zode G, Kasetti RB, Ran FA, Yan W, Sharma TP, Bugge K, Searby CC, Fingert JH, Zhang F, Clark AF, Sheffield VC. CRISPR-Cas9-based treatment of myocilin-associated glaucoma. *Proc Natl AcadSci USA.* 2017 Oct 17; 114(42):11199-11204. doi: 10.1073/pnas.1706193114. Epub 2017 Oct 2. PubMed PMID: 28973933; PubMed Central PMCID: PMC5651749.
4. Menaa F, Braghini CA, Vasconcellos JP, Menaa B, Costa VP, Figueiredo ES, Melo MB. Keeping an eye on myocilin: a complex molecule associated with primary open-angle glaucoma susceptibility. *Molecules.* 2011 Jun 27;16(7):5402-21. doi:10.3390/molecules16075402. Review. PubMed PMID: 21709622.
5. Abu-Amero K, Kondkar AA, Chalam KV. An Updated Review on the Genetics of Primary Open Angle Glaucoma. *Int J Mol Sci.* 2015 Dec 4;16(12):28886-911. doi:10.3390/ijms161226135. Review. PubMed PMID: 26690118; PubMed Central PMCID:PMC4691082.
6. Fuse N. Genetic bases for glaucoma. *Tohoku J Exp Med.* 2010 May;221(1):1-10. Review. PubMed PMID: 20431268.
7. Pang IH, McCartney MD, Steely HT, Clark AF. Human ocular perfusion organ culture: a versatile *ex vivo* model for glaucoma research. *J Glaucoma.* 2000 Dec;9(6):468-79. Review. PubMed PMID: 11131754.
8. Tomczyk-Socha M, Turno-Kręcicka A. A Novel Uveolymphatic Drainage Pathway-Possible New Target for Glaucoma Treatment. *Lymphat Res Biol.* 2017 Oct 27. doi: 10.1089/lrb.2017.0019. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29077522.

RÉFÉRENCES

- i. CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- ii. CAS9 : CRISPR Associated Protein 9
- iii. PNAS : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America