



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.18 : BMOL 12

Date : 3/11/2020

Plage horaire : 11h30-12h30

Enseignant : DUFOURCQ Pascale

N°ISBN : 978-2-37366-088-3

Ronéistes

REMER Charline – enaxeny@gmail.com

JAURETCHE Maia – maia.jauretcche@gmail.com

Thérapie génique et cellulaire

Plan du cours :

I - Introduction

II - Différentes approches de thérapie génique

III - La thérapie génique : vecteurs possibles

IV - Thérapie génique in vivo ou ex vivo

A - Thérapie génique in vivo

1 - Thérapie génique in vivo : surexpression génique

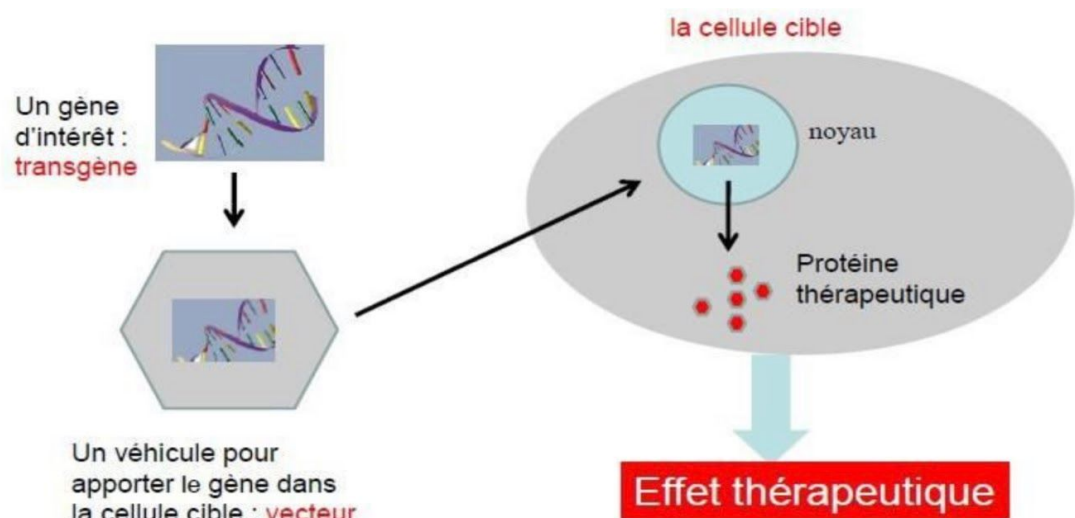
Objectifs du cours : Toujours dans l'application des biothérapies, on a vu la production des protéines recombinantes à usage thérapeutique, les bio médicaments. Maintenant, nous allons parler de la thérapie génique et cellulaire.

I. Introduction

La **thérapie génique**, c'est le transfert d'un nouveau matériel génétique dans les cellules, un tissu d'un individu, et dont il résulte un **bénéfice thérapeutique**.

Pour faire une thérapie génique, il faut que la cellule du patient soit capable de synthétiser une protéine et que celle-ci est un effet thérapeutique. C'est la cellule du patient qui va être modifiée. Pour cela, il faut :

- un **gène d'intérêt**, que l'on appelle le transgène ;
- un **véhicule**, pour apporter le transgène à la cellule cible, c'est le vecteur ;
- cellule cible** du patient.



On va retrouver des vecteurs utilisés pour le clonage, en plus des vecteurs spécifiques.

L'objectif est donc d'incorporer le transgène dans la cellule du patient afin d'avoir un effet thérapeutique.

Attention, chez l'homme, la seule thérapie génique autorisée est la thérapie génique somatique. On ne peut pas toucher aux cellules germinales.

Le but « ultime idéal », serait qu'une **administration unique** d'une version « corrigée » du gène résulterait de façon définitive en une correction du déficit génétique et en une **guérison de la maladie**. Ce but est compliqué à atteindre.

Il existe différentes approches de thérapie génique :

-**palier à l'absence ou déficience d'un gène**, responsable d'une maladie, en introduisant une copie fonctionnelle de ce gène ;

-**surexprimer une protéine** dont l'activité aurait un impact thérapeutique

-**inactiver un gène néfaste**, utilisation siRNA ou ARN interférent ou antisens ;

-**modifier l'activité des cellules cibles**, notamment dans le cas de cancer

La thérapie génique est un **concept ancien** qui a débuté dans les années 1970. Au début, il a été développé car on pensait qu'on allait facilement pouvoir traiter les maladies génétiques monogéniques. Un gène est muté, il est responsable de la pathologie, et avec cette méthode on pensait qu'en apportant le gène normal, il n'y aurait plus de problème. Dans la réalité, la thérapie génique est un concept compliqué, et même si c'est utilisé pour les maladies monogéniques, cette méthode est beaucoup plus utilisée sur d'autres pathologies.

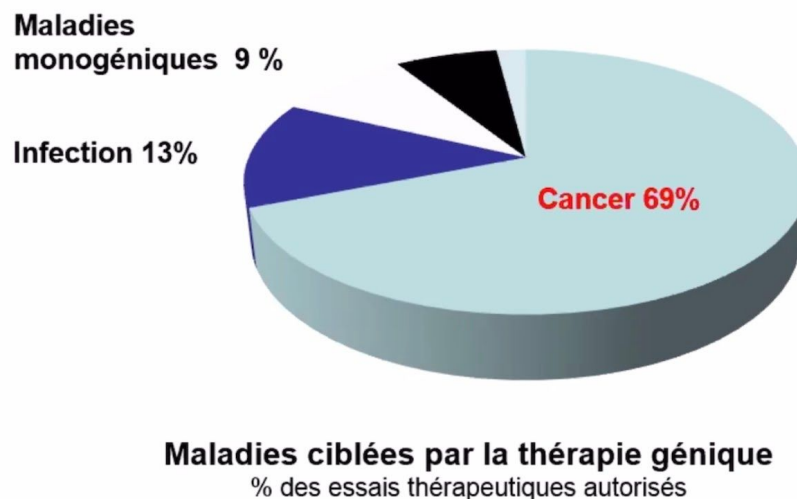
Quelques médicaments issus de la thérapie génique commencent à être commercialisés, cependant beaucoup sont encore au **stade d'essai clinique**. En effet, il va y avoir des verrous technologiques à lever. De plus, toutes ces approches de thérapie géniques sont basées sur la connaissance des pathologies et notamment sur la physiopathologie. Certaines fois, on n'a pas assez de connaissances pour pouvoir utiliser la thérapie génique.

	SUR LE MARCHÉ	EN VOIE D'AUTORISATION	PHASE III	PHASE I / II
• DERMATOLOGIE			1	2
• HÉMATOLOGIE			3	16
• MALADIES MÉTABOLIQUES	Tirpavovec 2012		5	23
• NEUROLOGIE			1	4
• ONCOLOGIE (cancers rares)			1	2
• OPHTALMOLOGIE	Voretigene Neparvovec		3	24
• AUTRES	Strimvelis 2016	1	2	13
TOTAL	3	1	16	84

Si on regarde, le type de pathologie que l'on va pouvoir traiter par thérapie génique, elles sont variées dermatologie, hématologie, neurologie, ophtalmologie etc.

Les médicaments mis sur le marché, il y en a peu. La thérapie génique se développe depuis des années mais il y a encore beaucoup de médicaments en phase clinique.

Au début, on pensait traiter majoritairement les maladies monogéniques mais, aujourd'hui on voit que 69% des pathologies traitées sont les **cancers**.

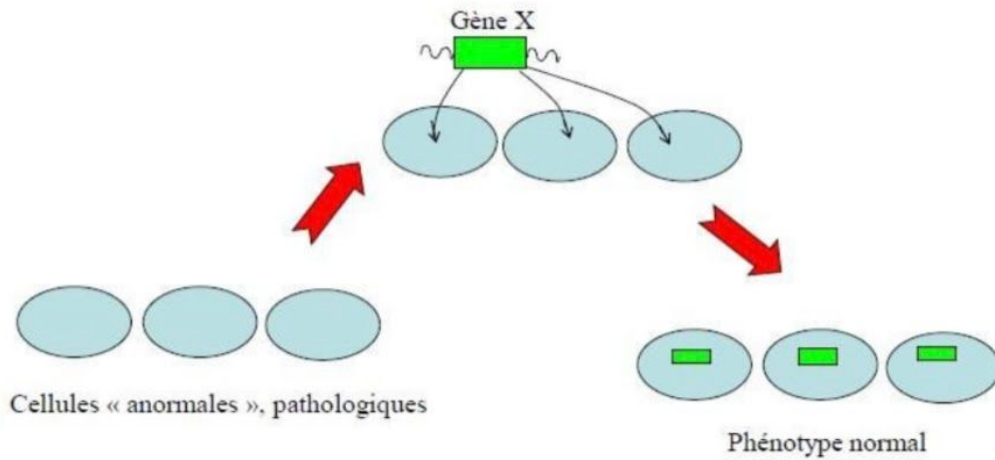


II. Différentes approches de thérapie génique

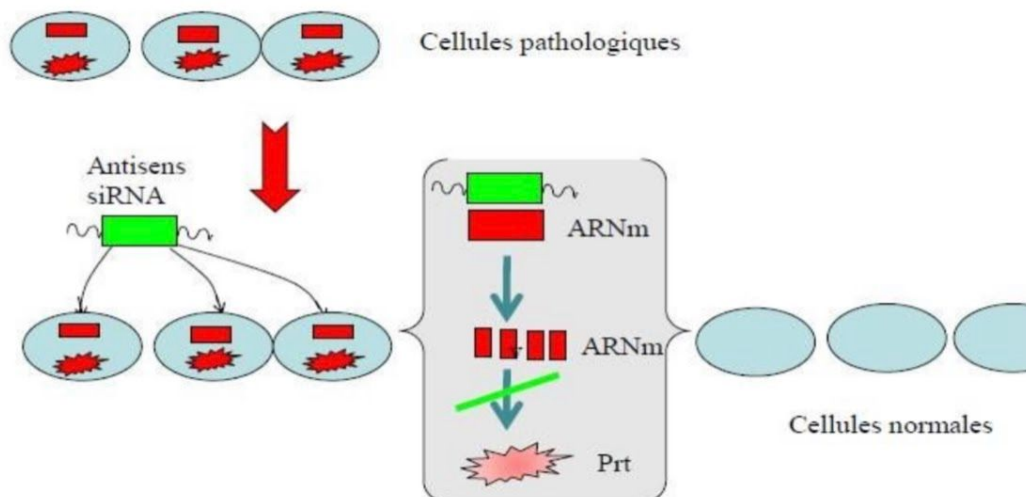
Les différentes stratégies lorsque l'on parle de thérapie génique :

-thérapie génique d'augmentation : c'est l'exemple typique d'une maladie monogénique avec un gène altéré et l'objectif est d'amener et de réparer ce gène. Ici des cellules sont anormales car le gène X est muté ou absent, il faut alors amener le gène X pour que ces cellules reprennent un phénotype normal.

C'est utilisé dans des maladies monogéniques telles que la **mucoviscidose** ou la **maladie de Duchenne**. C'est une stratégie qui fonctionne pour laquelle des médicaments sont sortis. Mais cette méthode sera surtout couplée à de la thérapie cellulaire.

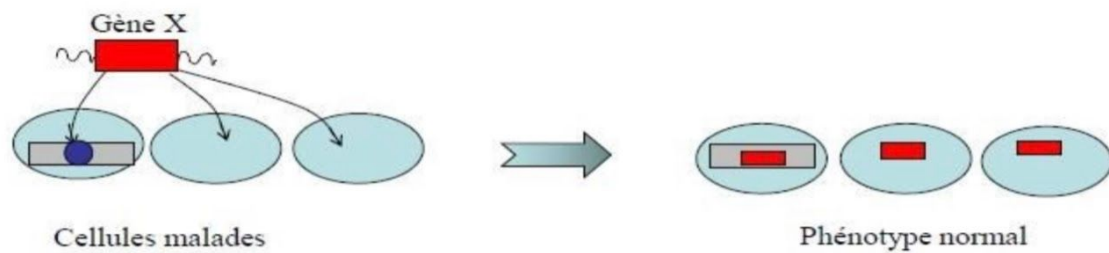


-**thérapie génique par inhibition ciblée** : il y a un excès de production de la protéine, ici en rouge codé par le gène en rouge. Ces cellules vont avoir un phénotype pathologique. Dans ce cas-là, on va **inhiber l'expression de la protéine**. On va pouvoir utiliser 2 stratégies : stratégie **antisens** ou stratégie **ARN interférent** (=siRNA). Ces deux types de molécules vont venir dégrader ou bloquer la production de la protéine.

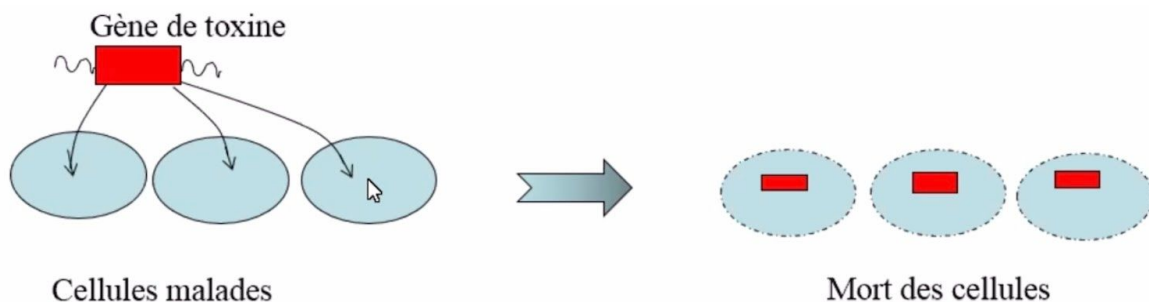


Ici, on bloque la production de la protéine au niveau de l'ARNm. Le but c'est de passer d'un phénotype pathologique avec un excès de protéine rouge à des cellules redevenues normales car elles ne peuvent plus exprimer la protéine.

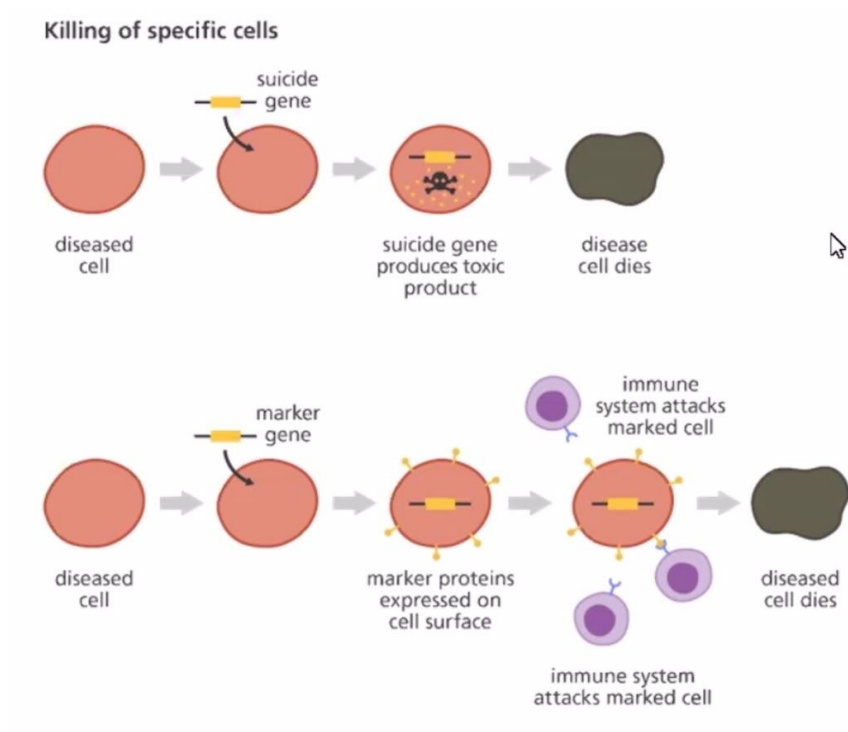
-thérapie génique de remplacement : remplacement d'un gène défectueux ou correction ciblée de la mutation. L'évolution technologique nous permet aujourd'hui de corriger directement la mutation ou un fragment de gène.



-thérapie génique de suppression : suicide/prodrogue : surexprimer un gène qui va donner une susceptibilité aux cellules. Celles-ci vont devenir sensible aux drogues. Cela va être utilisé dans le cas de cancer, il y a intégration par exemple d'un gène de toxine et les cellules pourront alors réagir à une molécule injectée et les cellules cancéreuses vont alors être détruites par ce système.



On a une cellule tumorale, on va injecter le gène suicide dans la cellule ; ce gène va produire un produit toxique qui va tuer spécifiquement la cellule qu'il a intégrée.



Plus récemment, un autre type de stratégie s'est développé. C'est le couplage d'une modification génique avec de la thérapie cellulaire. On va récupérer les cellules de l'immunité d'un patient, on les modifie génétiquement. Ces cellules de l'immunité modifiées vont pouvoir spécifiquement reconnaître des cellules tumorales et les détruire. Actuellement ces technologies, appelées **Car-T cells**, sont en pleines expansions.

Pour cette dernière stratégie, il y a la mort des cellules soit par **l'utilisation de gènes suicides**, soit par la **reconnaissance d'antigènes spécifiques**.

Au fil du temps, la technologie évolue et permet l'apparition de stratégie plus complexe.

Les étapes de la thérapie génique :

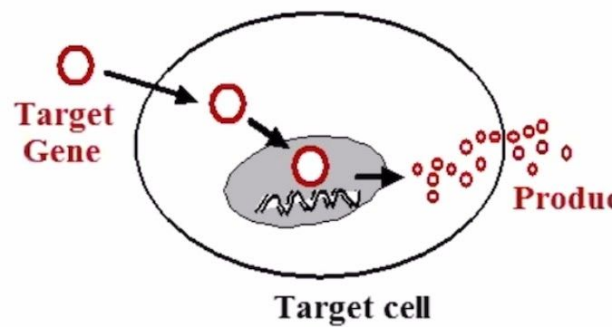
1)**Identifier le(s) gène(s) responsable(nt)**. C'est la recherche fondamentale et clinique qui permet de nous dire pour quelle pathologie il faut surexprimer ou inhiber telle protéine.

2)**Construire le transgène** : génie génétique

3) **Transférer le transgène** dans les cellules cibles,

- **ADN nu** ou **vectorisé** (virus, liposomes);
- Thérapie **in vivo** ou **ex vivo**.

4) **évaluer l'efficacité du transgène**, de **l'expression** de la protéine et **l'état du patient**. Pour que la thérapie génique soit validée, il faut un effet thérapeutique.



C'est une méthode complexe, avec de nombreuses étapes, chacune d'entre elles doit être réalisée sans problèmes pour que la thérapie génique soit efficace.

III. La thérapie génique : vecteurs possibles

Les vecteurs utilisés sont les mêmes que pour la production de protéines recombinantes dans les cellules.

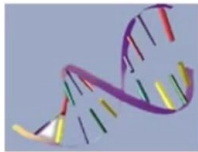
Il existe :

-les vecteurs non viraux : **ADN plasmidique nu** ou les **liposomes**

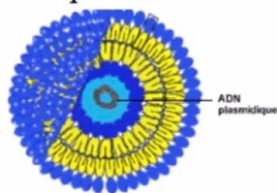
-les vecteurs viraux : **rétrovirus** ou **adénovirus**

Vecteurs non viraux

ADN plasmidique nu

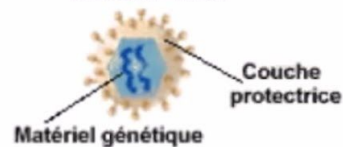


Liposome

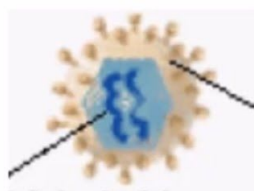


Vecteurs viraux

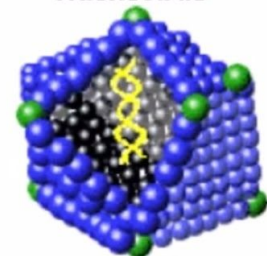
Vecteur viral



Rétrovirus



Adénovirus



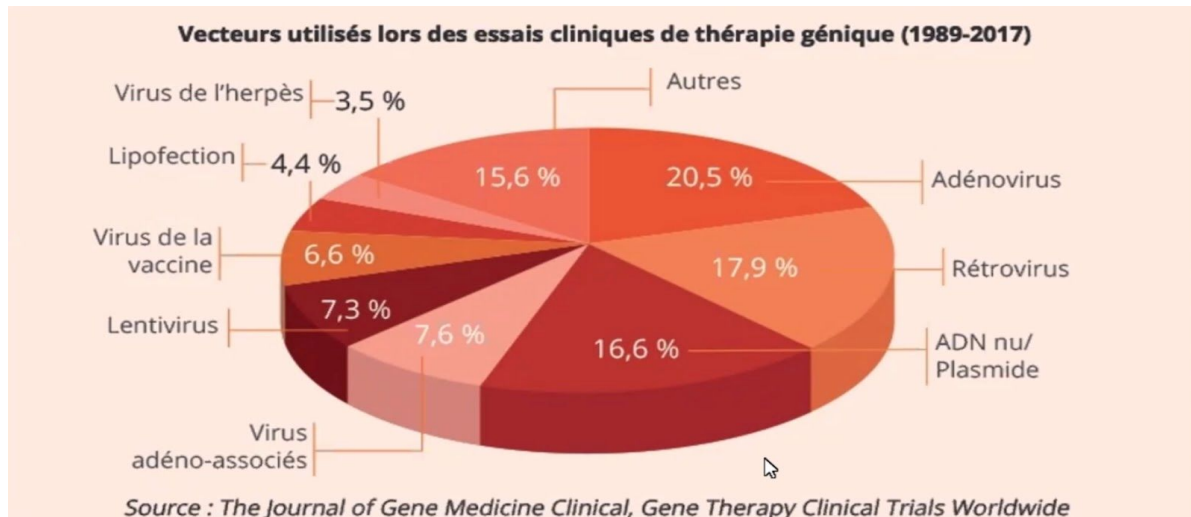
Pour les thérapies géniques on utilise beaucoup les particules virales, c'est-à-dire les :

-**rétrovirus** : peuvent s'intégrer dans des cellules qui se divisent et l'intégration se fait dans le génome ;

-**adénovirus** : peuvent s'intégrer dans des cellules latentes, qui ne se divisent pas, mais l'intégration ne se fait pas dans le génome.

Ces derniers sont des virus inactivés dont le génome a été modifié pour porter le transgène.

La majorité des vecteurs utilisés en thérapie génique sont les adénovirus, il y a ensuite les rétrovirus puis les ADN nu/plasmide.



Attention, ici on n'utilise pas des cellules, on **l'injecte directement au patient** !

Quand on utilise un adénovirus il va y avoir une **réponse immunitaire** et cela peut poser des problèmes. Des améliorations biotechnologiques ont été faites et il existe maintenant des **AAV**, ce sont des adénovirus modifiés qui permettent l'intégration du transgène dans le génome et ont l'avantage de produire une réponse immunitaire beaucoup moins importante.

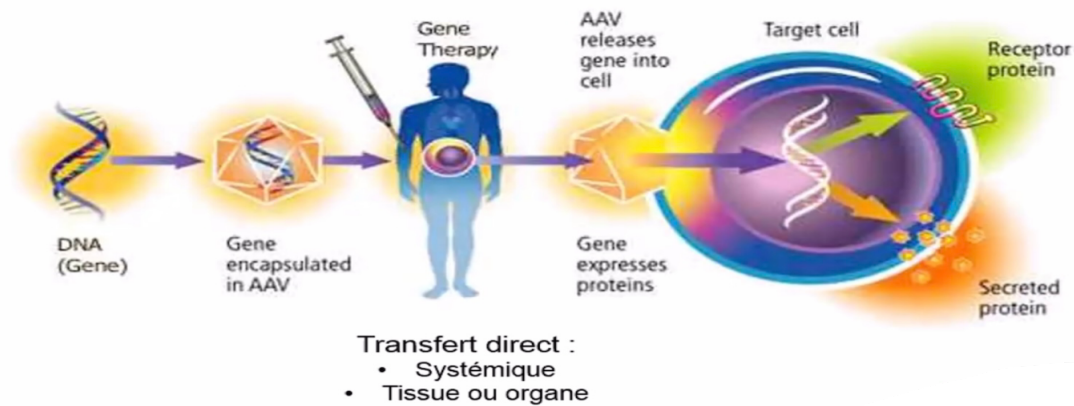
Les **lentivirus** sont des rétrovirus modifiés et qui sont beaucoup **mieux tolérés** par l'organisme.

Pour transférer le transgène il y a des méthodes physiques et chimiques, avec l'utilisation de **liposomes** par exemple. Tout un pan de recherche s'intéresse à améliorer ces transferts de gènes pour qu'ils soient plus efficaces, en utilisant d'autres structures comme des **nanoparticules**, des **micelles** ou encore des **dendrimères**.

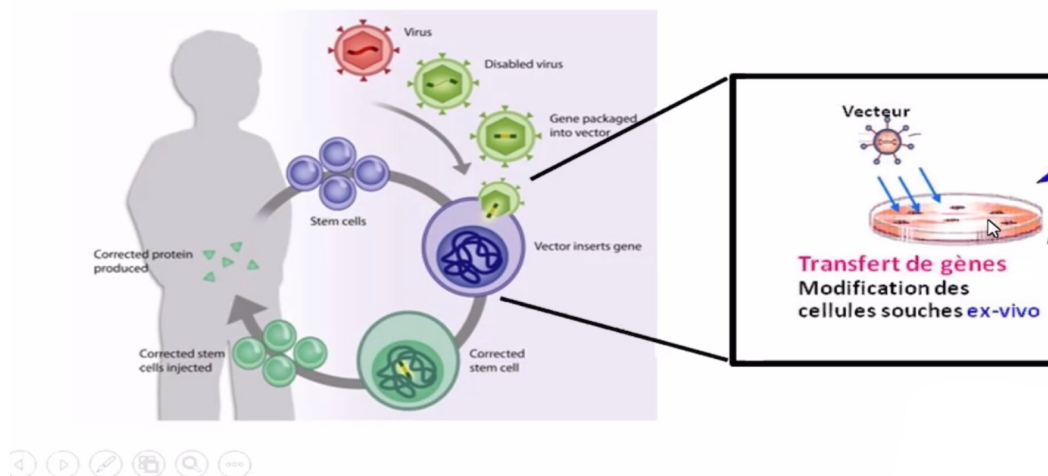
IV – Thérapie génique in vivo ou ex vivo

Il y a 2 types de thérapie génique. Dans le cas de la **thérapie génique in vivo**, on va injecter directement le transgène ou le virus chez l'homme. Pour la **thérapie génique ex vivo**, on va modifier les gènes de cellules en ex vivo. Puis on va les réinjecter chez l'homme. On combine donc de la thérapie génique et cellulaire.

Dans la thérapie in vivo, le patient se voit injecter, directement, soit le transgène soit le transgène utilisant un vecteur qui peut être des particules virales. On peut avoir une **injection en systémique** (= dans la circulation sanguine) ou une **injection dans un tissu ou organe particulier**. Le but c'est qu'au niveau de la cellule du patient, la particule virale soit intégrée et qu'il y ait expression de la protéine d'intérêt.



Dans la thérapie ex vivo, on va prélever des cellules au patient, notamment des **cellules souches**. Ces cellules vont être modifiées ex vivo par des systèmes de cultures, utilisation de particules virales. On va sélectionner les cellules souches **modifiées** pour les **ré-injecter** aux patients.

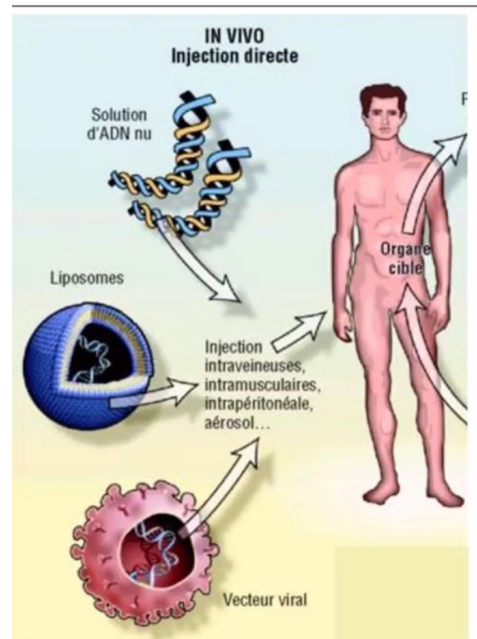


A – Thérapie in vivo

Pour transférer le transgène, on peut faire une **injection systémique**, une injection dans un **tissus** (intramusculaire, intra oculaire, intracardiaque) ou même utiliser un **aérosol**. Ce dernier permettra d'amener le transgène au niveau pulmonaire.

Les vecteurs qui peuvent être utilisés sont :

- ADN nu (plasmide)
- ADN liposome
- Virus recombinants

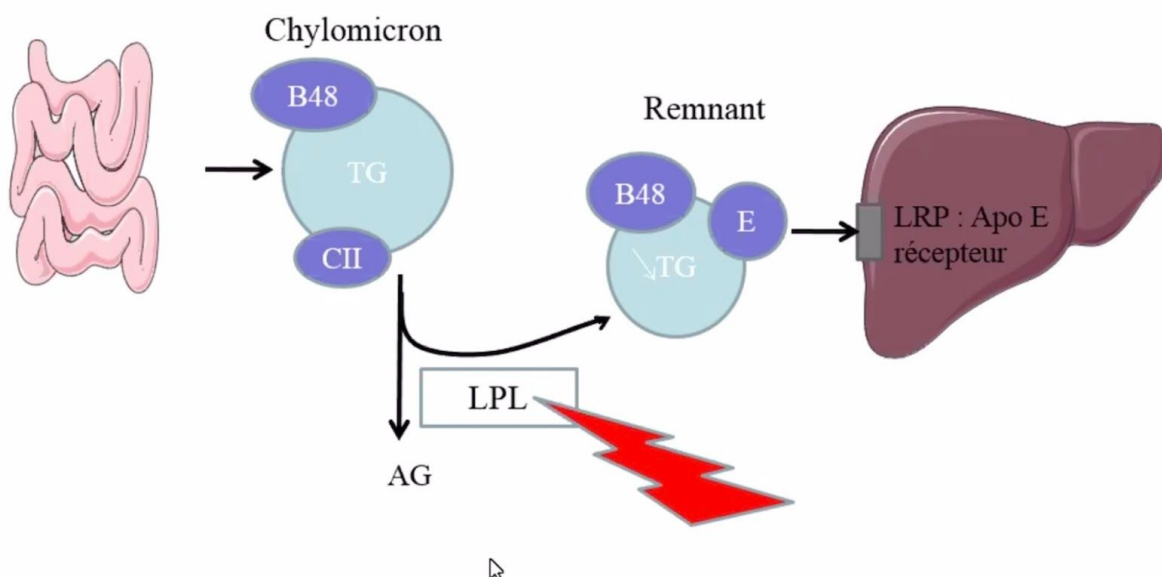


1 – Thérapie génique in vivo : surexpression génique

Exemple : L'Hyperchylomicronimie

Cette pathologie est due à une augmentation d'une lipoprotéine, le **chylomicron**. Celle-ci transporte les triglycérides dans le sang. Ces chylomicrons normalement dans le sang et dans les vaisseaux sanguins vont être métabolisés et catabolisés par une enzyme que l'on appelle la **lipoprotéine lipase**. Cette enzyme hydrolyse les triglycérides qui seront ensuite utilisés par l'organisme et va produire un chylomicron qui aura perdu ces triglycérides.

Certaines pathologies provoquent un **déficit de cette enzyme** et ces patients ont alors une **augmentation de chylomicrons** circulant et donc **hypertriglycéridémie**.



Cette hypertriglycéridémie peut être fatale. En effet, quand on a beaucoup de triglycérides circulant dans le sang, donc beaucoup de chylomicrons, on peut faire des **pancréatites sévères** aiguës. Dans ce cas, il faut aller aux urgences.

Les patients avec ces pathologies vont alors avoir des crises de pancréatites sévères malgré un régime pauvre en lipides.

En 2013, le médicament **glybera** arrive sur le marché en Europe. C'est une particule virale, un AAV qui contient un transgène. Celui-ci code pour l'enzyme, la lipoprotéine lipase.

Normalement, au niveau des vaisseaux sanguins à la surface des cellules endothéliales se trouve la lipoprotéine lipase. Celle-ci permet de dégrader les triglycérides du chylomicron. Chez ces patients, l'enzyme est absente. On leur injecte donc un **AAV**, au niveau musculaire. Le muscle va alors produire la protéine qui est **soluble**, et qui va se retrouver au niveau des cellules endothéliales. Les patients traités vont alors exprimer la protéine au niveau du muscle mais aussi au niveau de l'endothélium. Ce médicament augmente le catabolisme des chylomicrons, ce qui va diminuer les crises de pancréatites chez ces patients.

Si on regarde la composition du médicament, elle est différente des compositions habituelles puisqu'elle indique 3×10^{12} copies du génome/ml.

Une injection unique dans le muscle devrait suffire. Le problème majeur de ce médicament est son prix qui s'élève à 1 million de dollar, donc personne ne peut l'utiliser.