



Université de Djilali LIABES  
Faculté de médecine TALEB MOURAD  
département de médecine  
2 année médecine 2024/2025

## **THERAPIE GENIQUE ET PHARMACOGENETIQUE**

Dr HABBATI. H

Maitre assistante en histologie, embryologie  
et génétique cliniques

## Définition :

- La thérapie génique est une technique innovante de médecine moléculaire
- Le principe de la thérapie génique est de remplacer, à l'intérieur des cellules malades, un gène muté défectueux responsables de la maladie par un gène fonctionnant normalement dans le but de produire des protéines thérapeutiques nécessaires pour corriger la maladie visée

# Thérapie génique



Thérapie génique = Réparation d'un gène défectueux chez un patient atteint

Dès le début des années 1970, le concept d'utiliser à des fins thérapeutiques de l'ADN exogène pour remplacer un ADN muté chez des patients atteints de maladies génétiques a été évoqué par certains scientifiques (Rogers, puis Friedmann et Roblin).

Une vingtaine d'années de développement expérimental ont été nécessaires ensuite pour permettre la réalisation d'un premier essai clinique utilisant cette approche chez l'humain

➤ A partir de 1995, Premiers essais cliniques chez l'homme principalement dans les syndromes d'immunodéficience congénitaux ou héréditaires

➤ En 1995, traitement d'une fillette de trois ans atteinte d'un déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (DICS par déficit en ADA), grâce à l'injection de cellules souches et de lymphocytes génétiquement modifiés .

➤ en 2000, rétablissement de l'immunité chez 5 bébés atteints d'immunodéficience combiné sévère lié à l'X (SCID-X1) mais 4 d'entre eux développèrent une leucémie et un bébé en mourut

Actuellement  près de 2000 essais cliniques de thérapie génique sont en cours

➤ 65 % / traitement du cancer

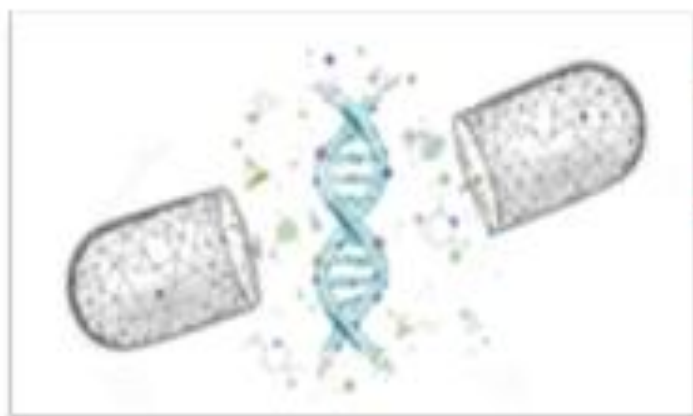
➤ 10% dans le domaine cardiovasculaires

➤ 10% seulement dans les maladies monogéniques comme l'amaurose congénitale de Leber, l'hémophilie et la bêta-thalassémie.

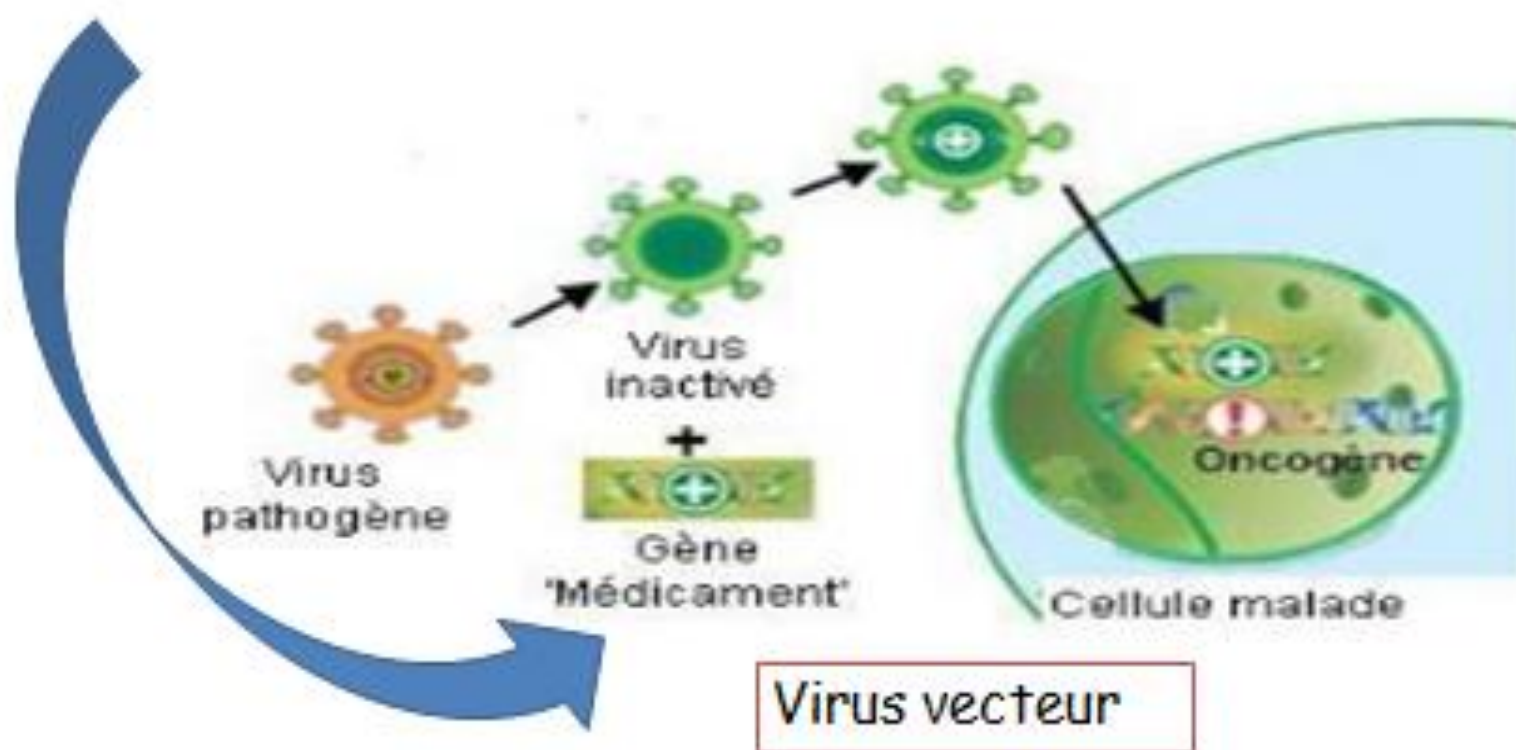
## Stratégies de thérapie ciblée

1/ Première stratégie développée en thérapie génique: Suppléer un gène « malade »=le transfert d'un « transgène »

- Consiste à importer la copie d'un gène fonctionnel dans une cellule cible, pour qu'elle s'y exprime et aboutisse à la production de la protéine qui fait défaut.
- Utilisation d'un vecteur viral ou non viral



gène « médicament »  
ou transgène





- Il s'agit de la première stratégie développée en thérapie génique, pour traiter les maladies monogéniques.
- Le gène thérapeutique importé ne modifie pas le gène malade : il vient simplement s'ajouter au patrimoine génétique des cellules pour compenser la fonction déficiente.

Corriger un gène défectueux implique d'abord de connaître le gène et le rôle de la protéine qu'il encode.

l'isolation de ce gène non muté à partir de cellules saines (en le munissant de séquences indispensables à sa régulation permettra d'insérer la « construction génique » dans un vecteur, généralement un virus désactivé.

## transfer de gène in vivo

- Le transfert de gène dans les cellules cibles peut s'effectuer directement dans le tissu ou organe d'intérêt de différentes manières :
  - par injection systémique ou
  - locale comme au niveau de la rétine ou du tissu musculaire.

## transfer de gène ex vivo

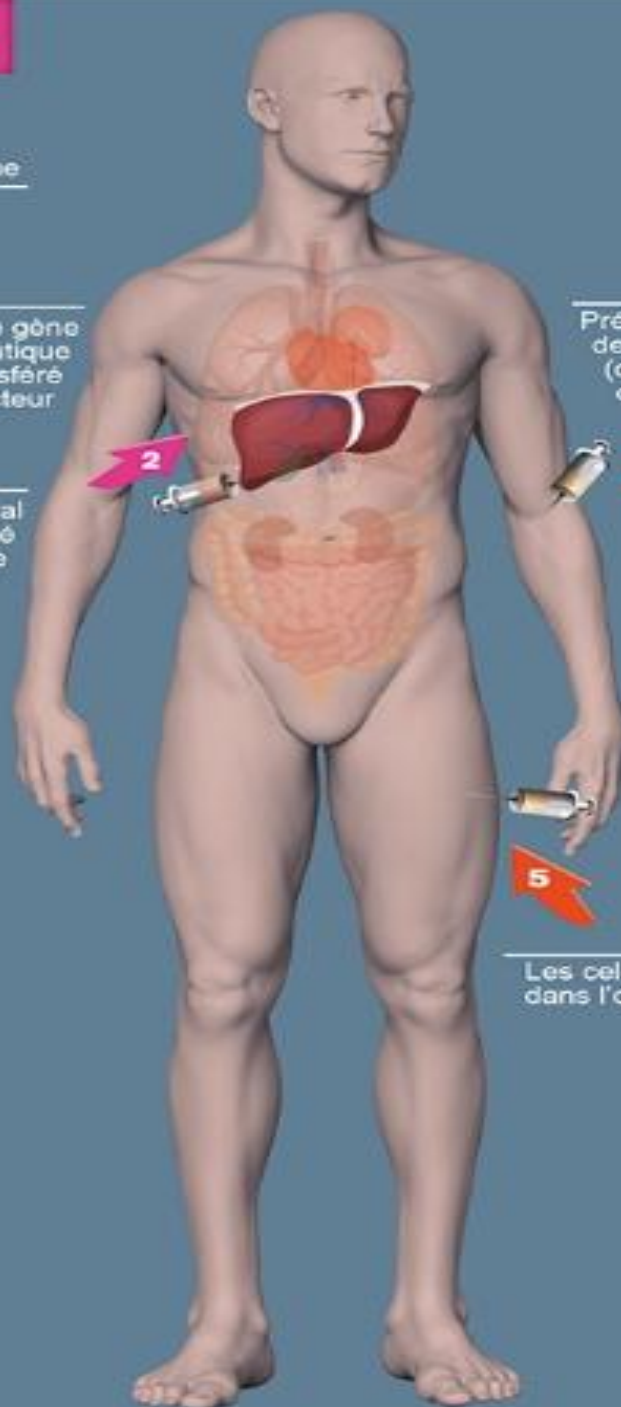
- Une alternative à ce transfert de gène direct est constituée par le transfert de gène ex vivo
- Il s'agit d'un procédé comportant plusieurs étapes successives :

- 1 une étape de prélèvement des cellules d'intérêt chez l'individu à traiter
- 2 une étape de culture de ces cellules d'intérêt (ex vivo)
- 3 la réalisation du transfert de gène sur les cellules d'intérêt pendant l'étape de culture
- 4 la réimplantation chez l'individu des cellules modifiées par le transfert de gène.

## Modification des cellules *IN VIVO*



Le vecteur viral est directement injecté dans l'organe cible



Prélèvement de cellules souches (dans le sang ou la moelle osseuse)



3 Le vecteur viral pénètre dans les cellules prélevées chez le patient

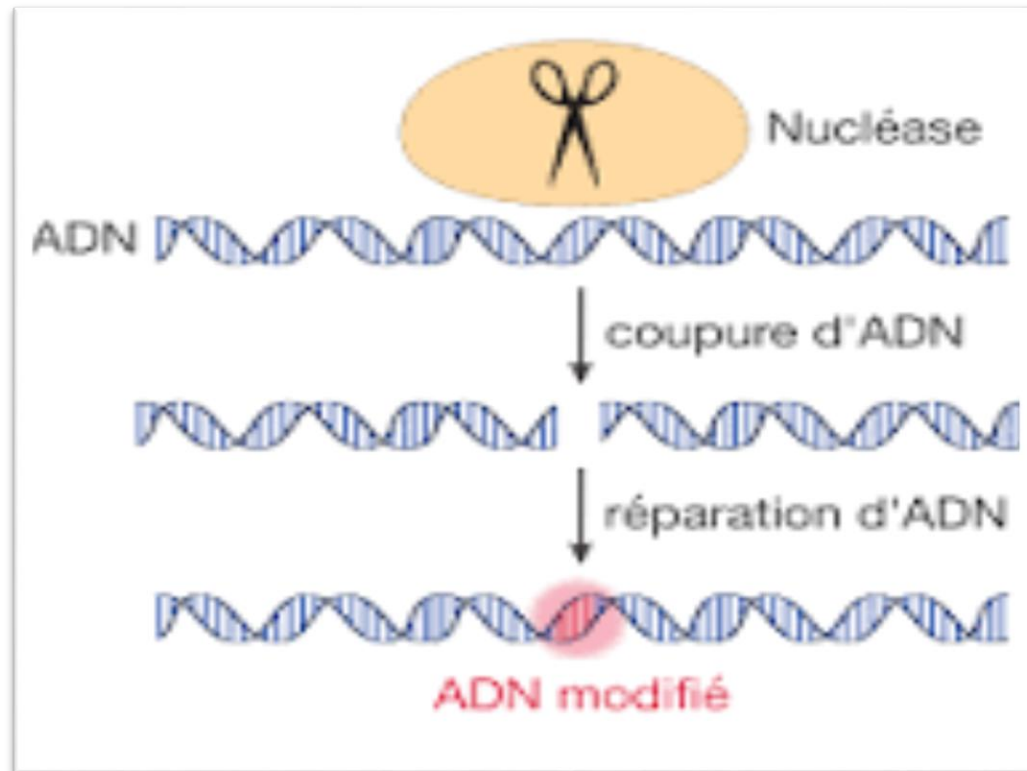


4 Les cellules se multiplient et expriment le gène thérapeutique

5 Les cellules sont réinjectées dans l'organisme du patient

## 2/ Seconde stratégie: Édition génomique ou modification localisée de séquence génomique

- Réparation des mutations génétiques de façon ciblée/  
Éliminer ou réparer un gène altéré directement dans la cellule



Elle nécessite d'importer plusieurs outils dans la cellule :

- des enzymes spécifiques(nucléases ) qui vont couper le génome là où c'est nécessaire
- un segment d'ADN qui sert à la réparation du génome et permettra de retrouver un gène fonctionnel



Parmi ces outils, on trouve surtout  
**les outils CRISPR.**

.

# ***CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)***

est un système découvert chez les bactéries, utilisé à l'origine comme mécanisme de défense contre les virus.

Ce système a été adapté pour devenir un outil d'édition génomique révolutionnaire, permettant de ***couper***, ***insérer***, ***corriger*** ou ***inactiver*** des gènes de manière ciblée

Associés aux génomes porteurs de CRISPR, des gènes Cas (CRISPR associated protein) ont également été identifiés à proximité des locus CRISPR; ce qui permet aux chercheurs de les identifier comme complexe « CRISPR/Cas »

# LES COMPOSANTS DU SYSTÈME CRISPR-Cas9

## *1. Cas9 (CRISPR-associated protein 9)*

C'est une nucléase : une enzyme capable de couper l'ADN double brin à un endroit précis.

Elle agit comme des ciseaux moléculaires

## . *ARN guide = gRNA*

C'est une molécule artificielle qui guide Cas9 vers la séquence d'ADN cible.

Il comprend :

**crRNA (CRISPR RNA)** → reconnaît la séquence cible.

**tracrRNA (trans-activating crRNA)** → se lie à Cas9.

.

## ***Séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif)***

- Courte séquence située juste après la cible.
- Essentielle pour que Cas9 coupe. Sans PAM, il n'y a pas d'activité enzymatique

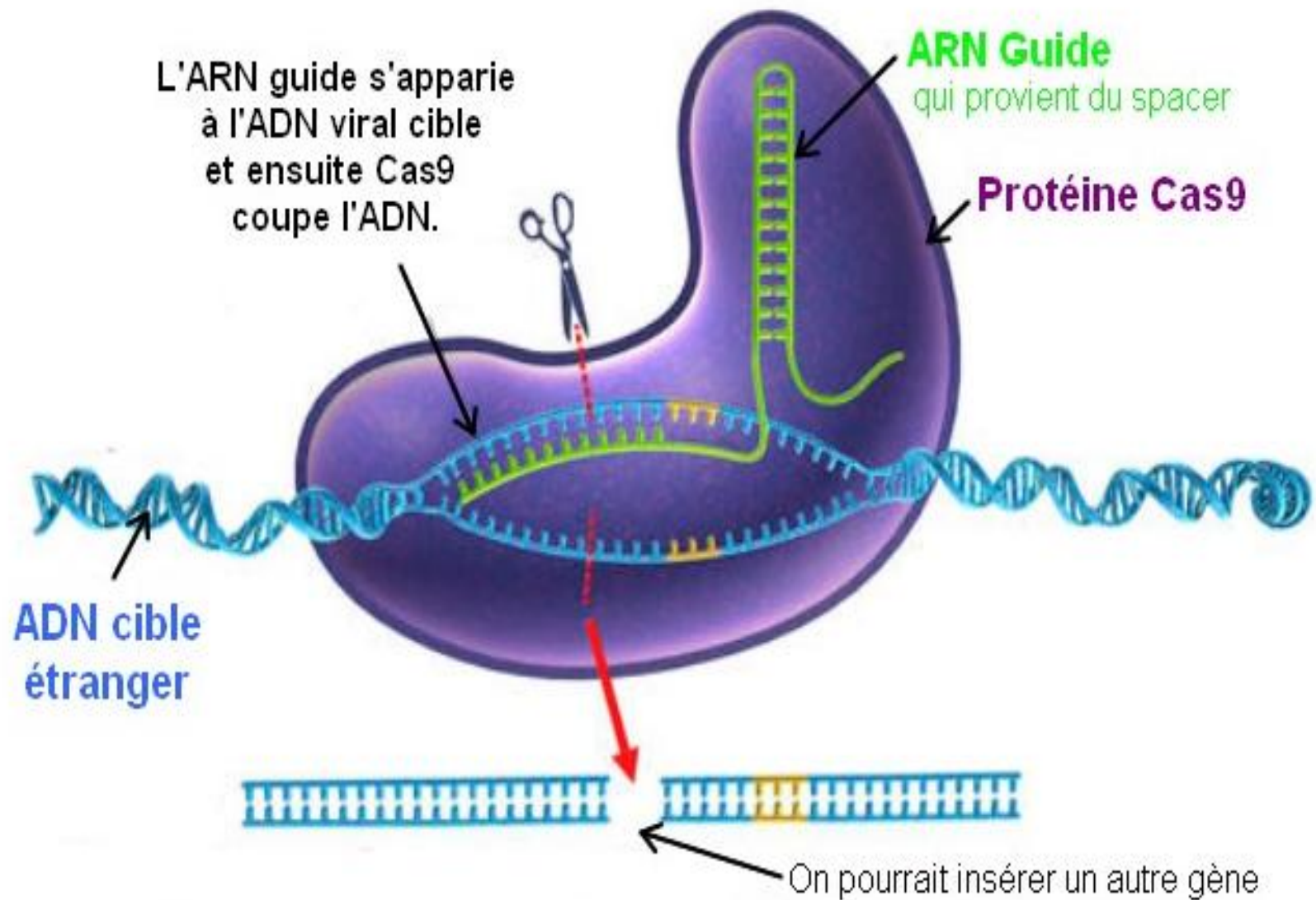
## Principe :

Si la bactérie est de nouveau attaquée par ce même virus,

- elle va créer un ARN guide (gRNA) qui correspond à l'ADN du virus.
- L'enzyme Cas9 va intégrer cette ARN qui va la guider jusqu'à l'ADN viral à couper
- Le découpage de cet ADN viral commencera lorsque Cas9 trouve un site PAM.
- La protéine Cas9 se fixe sur l'ADN cible et effectue une cassure double brin de l'ADN.

***Le découpage de l'ADN viral entraînera la mort du virus***





les chercheurs ont découvert que ce système peut couper l'ADN viral, mais également toutes les séquences d'ADN à un lieu précis.

Le lieu de coupure repose sur la spécificité de la complémentarité des bases entre l'ARN guide et l'ADN cible

## Intérêt

➤ savoir à quoi sert un gène/ grâce à la technique CAS9, on peut aller modifier ou découper un gène et regarder ce qu'il se passe pour comprendre à quoi servait ce gène.

➤ modifier grâce à CAS9 le génome de certaines levures pour leur faire produire des biocarburants.

➤ modifier l'ADN des moustiques pour les rendre résistants à la malaria.

La malaria, ou le palud parasite / le plus gros assassin de la planète cause 650 000 morts par an.!!

➤ modification du génome juste après la fécondation, pour faire complètement disparaître une maladie monogénique .

## Autres stratégies de thérapies génique

Modification de l'ARN(par modulation de l'expression )

- **modulation quantitative de l'expression**

interaction spécifique entre des ARN simples ou double brin avec des ARN messagers permet la dégradation de ces derniers.

- Cette approche trouve son application notamment  
*-pour dégrader de manière spécifique des ARN messagers mutés codant des protéines toxiques.*

## Utiliser des virus génétiquement modifiés pour tuer des cellules cancéreuses

Ces virus sont appelés oncolytiques. Ils sont modifiés génétiquement pour infecter spécifiquement les cellules tumorales qu'ils détruisent. Un premier virus oncolytique, issu d'une souche d'herpès, a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2015 (Imlygic). Il est indiqué dans le traitement du mélanome

.



- ***La modulation qualitative de l'expression***

consiste à intervenir de manière ciblée sur l'ARN messager notamment à l'étape d'épissage au cours de sa maturation pour éliminer des mutations délétères

La principale approche de modulation qualitative de l'expression développée à ce jour est le « saut d'exon » (exon skipping)

Cette technique consiste :

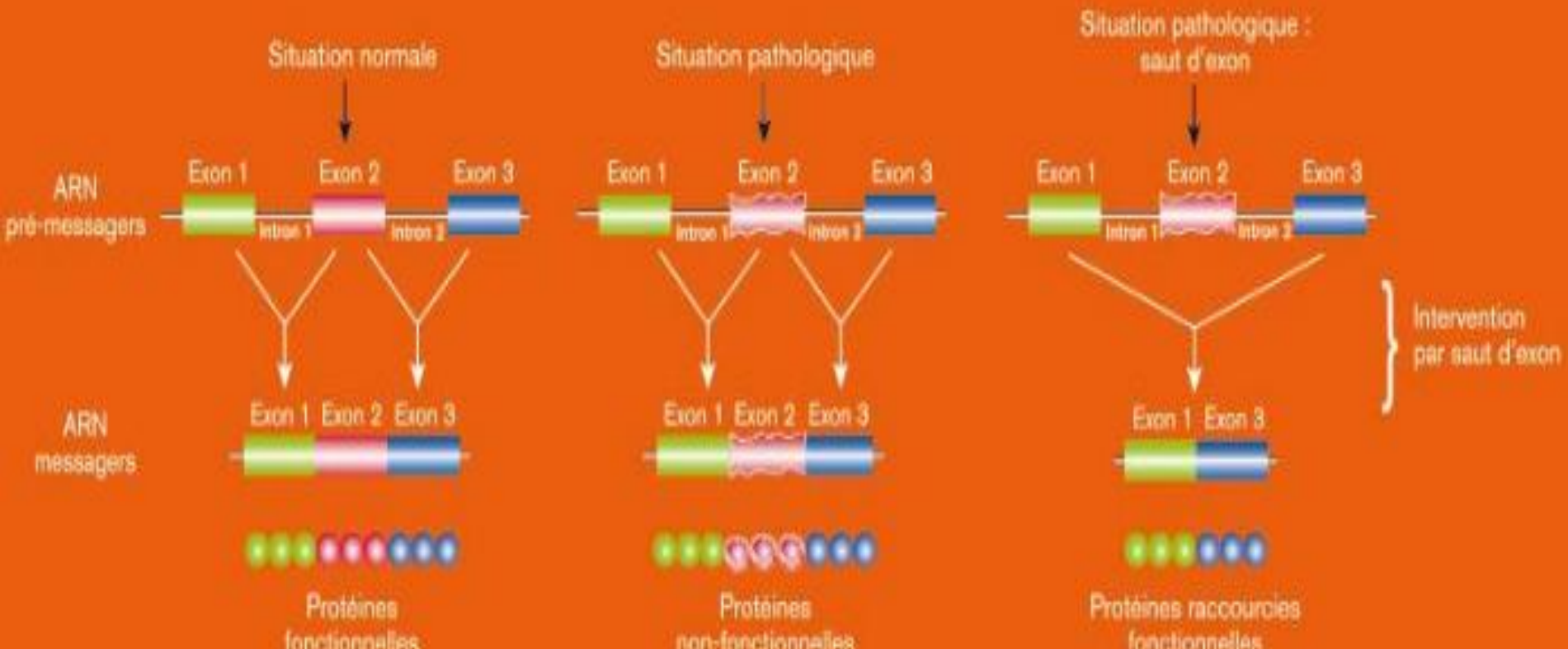
***à faire produire par la cellule une version modifiée de la protéine qui lui fait défaut.***

-Cela nécessite ***l'injection de petits oligonucléotides anti-sens qui se fixent sur l'ARN messenger transcrit à partir du gène muté et en modifient l'épissage*** : une étape importante avant sa traduction en protéine.





## modulation d'épissage



ainsi la protéine qui en résulte comportera donc une délétion qui correspond à la partie « excisée » par le « saut d'exon ».

- Cette stratégie ne peut ainsi avoir un intérêt thérapeutique ***qu'à condition que la partie « excisée » ne soit pas essentielle à la fonction de la protéine concernée***
- suite à la délétion de l'exon porteur de la mutation, une protéine partiellement tronquée, mais maintenant une fonctionnalité au moins partielle, doit pouvoir être exprimée

Exemple:

Dans la maladie de Duchenne, causée par des mutations dans le gène de la dystrophine

les approches de « saut d'exon » consistent à faire omettre les séquences du gène qui portent la mutation à l'origine de la maladie.

On obtient alors une dystrophine plus courte que la protéine normale, mais fonctionnelle.

# Les vecteurs

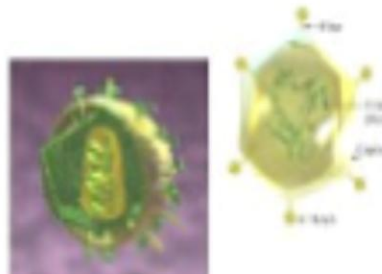


Acide nucléique exogène

Transfert de gène

**VECTEUR**

**Viral**



**Non viral**

(méthodes physiques  
et/ou chimiques)



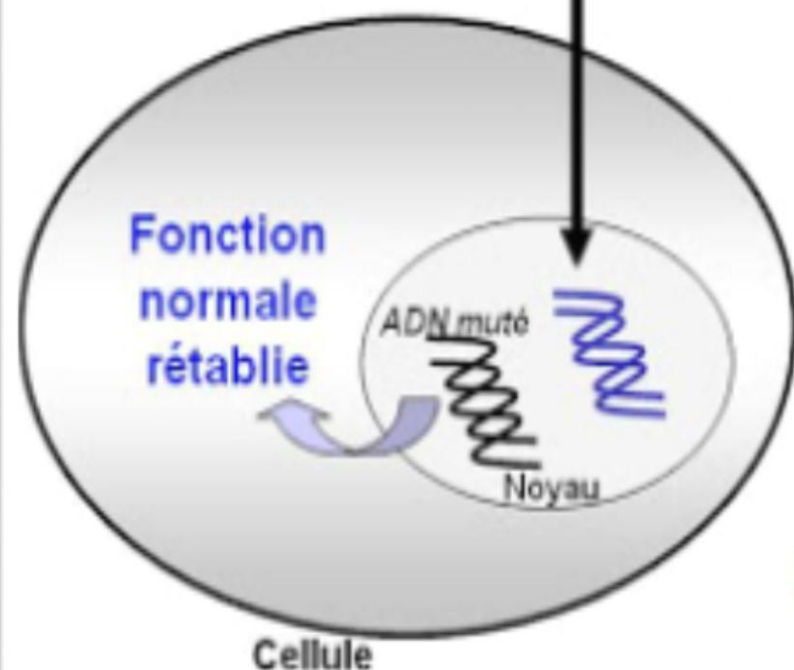
Electroporation



Lipidique/Cationique



ADN nu



■ Vecteur = système de transfert

➤ Transgène

➤ Séquences modifiant l'expression

Il existe actuellement différents types de vecteurs :

***les vecteurs viraux***: les plus efficaces actuellement mais qui peuvent déclencher des réponses immunitaires ou provoquer des cancers en s'insérant dans certaines séquences du génome

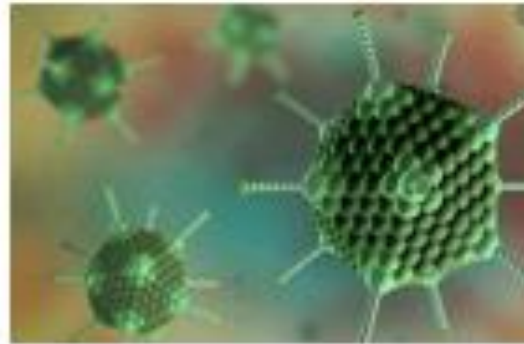
***les vecteurs non viraux*** qui ont été conçus pour répondre aux problèmes de sécurité, pour leur facilité de fabrication et pour assurer le transport de grandes quantités d'ADN

Les vecteurs viraux sont impliqués dans plus de 75% des essais cliniques de thérapie génique.

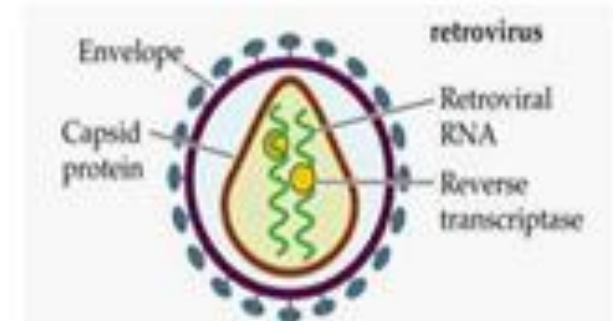
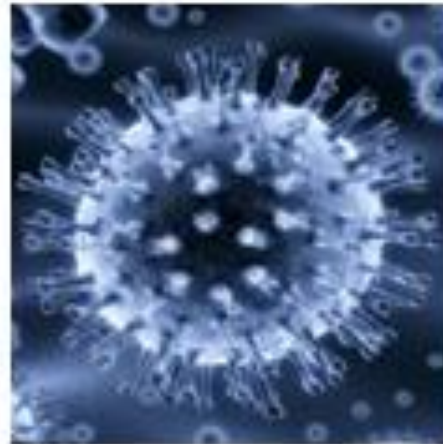
# Vecteurs viraux

Les plus fréquemment employés sont les rétrovirus (34 % des essais), les adénovirus (virus de la sphère rhinopharyngée, 27 %), les poxvirus (virus de la famille de la vaccine, 6 %), les lentivirus, les virus herpès ou les virus adénoassociés (AAV)

## Les adénovirus



## Les rétrovirus

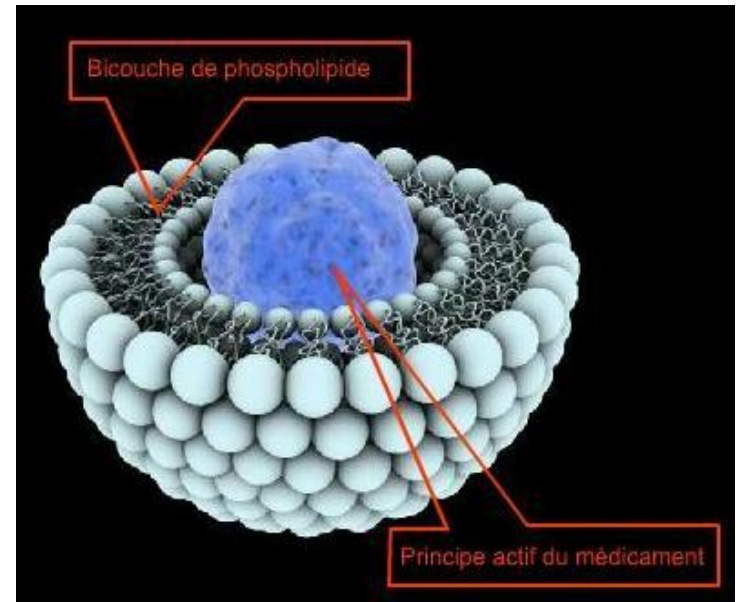




## Les vecteurs non-viraux

- plus faciles à produire, à manipuler et à stocker.
- Les liposomes classiques : Les liposomes sont constitués d'un centre aqueux et d'une ou de plusieurs membranes.

- Insertion du gène médicament compacté dans une sphère lipidique composée de deux membranes.
- L'endocytose permet de faciliter la pénétration de l'ADN dans la cellule en évitant la dégradation extracellulaire.
- Ce liposome fusionne alors avec la membrane cellulaire.
- Après l'ADN devra juste atteindre le noyau



## Les premières AMM

Deux produits de thérapie génique sont disponibles sur le marché actuellement :

La « Gendicine » commercialisée en Chine depuis 2020 / traitement de carcinomes de la tête et du cou,



Le « Glybera » commercialisé en Europe / traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase.



# Les médicaments innovants de thérapie génique approuvés

- **Gendicine** : C'est le premier médicament de ce type qui a été mis sur le marché, en Chine, en 2003. Il s'agit d'un adénovirus exprimant le gène p53 (codant pour un suppresseur de tumeur), indiqué dans le traitement de cancers de la tête et du cou.
- **Oncorine** : Mis sur le marché en Chine, en 2005, il s'agit d'un adénovirus oncolytique. Il est utilisé en combinaison avec une chimiothérapie pour le traitement de cancers nasopharyngés réfractaires.
- **Glybera** : C'est le premier médicament commercialisé en Europe, fin 2012, contre le déficit familial en lipoprotéine lipase. Il s'agit d'un vecteur adéno-associé. Il vient d'être retiré du marché faute de demande.
- **Imlygic** : Approuvé en 2015 aux Etats-Unis et en Europe, il est composé d'un virus oncolytique exprimant une protéine immunostimulante. Il est indiqué chez les adultes atteints de mélanome non résectable.
- **Strimvelis** : C'est le tout premier médicament combinant thérapie génique et cellulaire à avoir été autorisé au monde. Il a été approuvé en Europe en 2016. Indiqué dans l'ADA-SCID, il s'agit de cellules CD34+ autologues exprimant le gène ADA.
- **Zalmoxis** : Indiqué contre le rejet de greffe de moelle osseuse depuis 2016 en Europe, il repose sur la modification génétique de cellules T allogéniques avec un vecteur rétroviral.
- **Kymriah** et **Yescarta** : Approuvés en 2017 aux Etats-Unis, ils correspondent à des cellules T autologues génétiquement modifiées (*CAR T cell*) pour traiter des formes résistantes de lymphome aigu touchant les cellules B.
- **Luxturna** : Ce vecteur adéno-associé est indiqué dans la dystrophie rétinienne liée à la mutation RPE65. Il a été approuvé aux Etats-Unis fin 2017.

# Pharmacogénétique

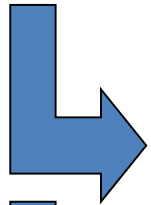
La pharmacogénétique est une branche de la génétique qui étudie comment les variations génétiques d'un individu influencent sa réponse aux médicaments.

- Elle vise à adapter les traitements médicamenteux en fonction du profil génétique du patient afin d'améliorer :
  - ❖ l'efficacité thérapeutique
  - ❖ la tolérance
  - ❖ de réduire les effets indésirables.

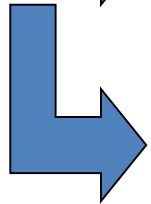
# Pharmacogénétique

**Pharmacogénétique**  **influence du patrimoine génétique sur le sort des médicaments**

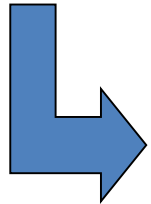
**Donc le but :**



**optimisation des décisions thérapeutiques en fonction du génome de l'individu et de la molécule cible**



**Meilleure prise en charge des malades**



**Diminution du coût des dépenses en médicaments**

# Définition des xénobiotiques

# Les xénobiotiques=

(du grec ancien xenos « étranger » et bios « vie »

sont des substances de faible poids moléculaire provenant de l'environnement, mais qui subissent une biotransformation dans l'organisme humain.

Cette biotransformation est sous la dépendance de nombreux facteurs :



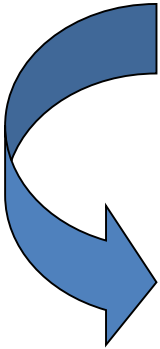
## Les xénobiotiques

(Toute substance chimique étrangère à l'organisme)

médicaments

polluants

composés alimentaires



introduction dans l'organisme

transformation

Action sur la cible

Elimination

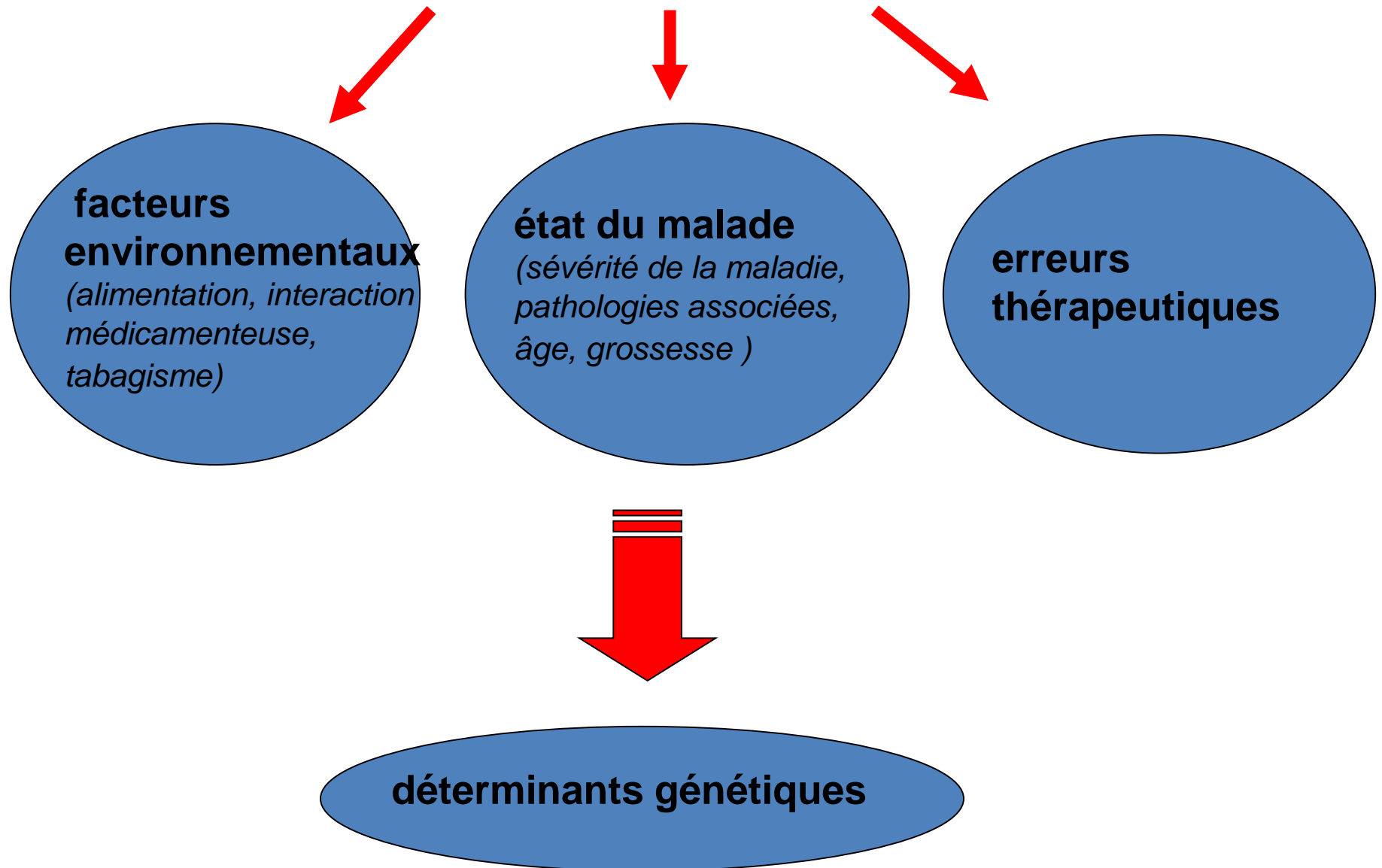
Enzymes de transport et  
enzymes du métabolisme  
des xénobiotiques (EMX)

Expression  
variable  
(polymorphisme)

## ***Les médicaments :***

Ils sont généralement de nature hydrophobe et doivent être métabolisés en composés hydrophiles pour être plus facilement éliminés dans la bile et dans les urines

## ***variabilité de la réponse aux médicaments***



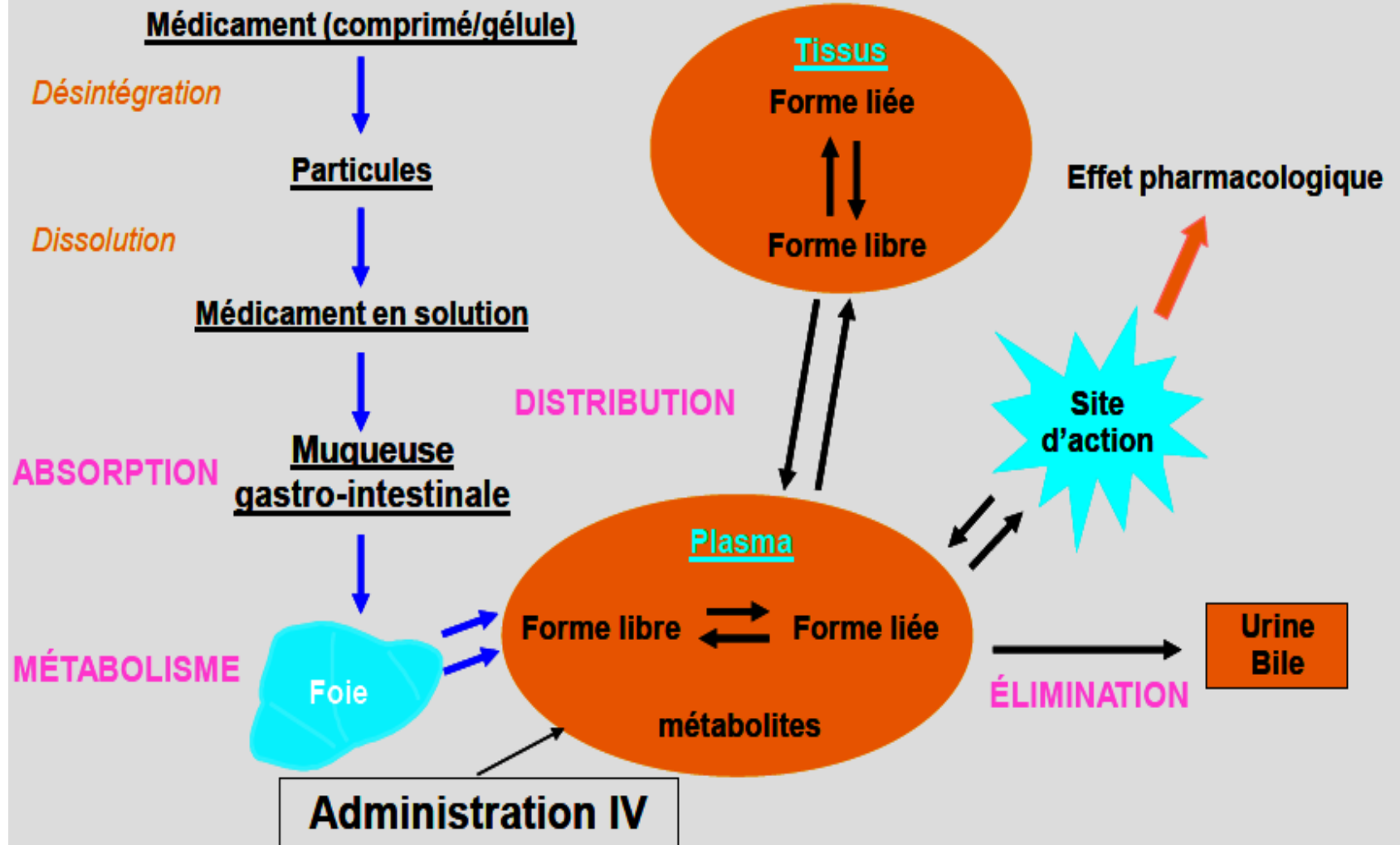
# **Métabolisme des xénobiotiques**

Après administration,

les médicaments doivent pénétrer dans le compartiment vasculaire pour atteindre leur cible, en franchissant la barrière intestinale, au niveau de laquelle il existe des transporteurs destinés à les expulser

Le métabolisme est ensuite essentiellement hépatique

# Administration orale



les enzymes qui participent à la biotransformation des médicaments sont schématiquement divisées en deux groupes :

# 1) les enzymes de phase I

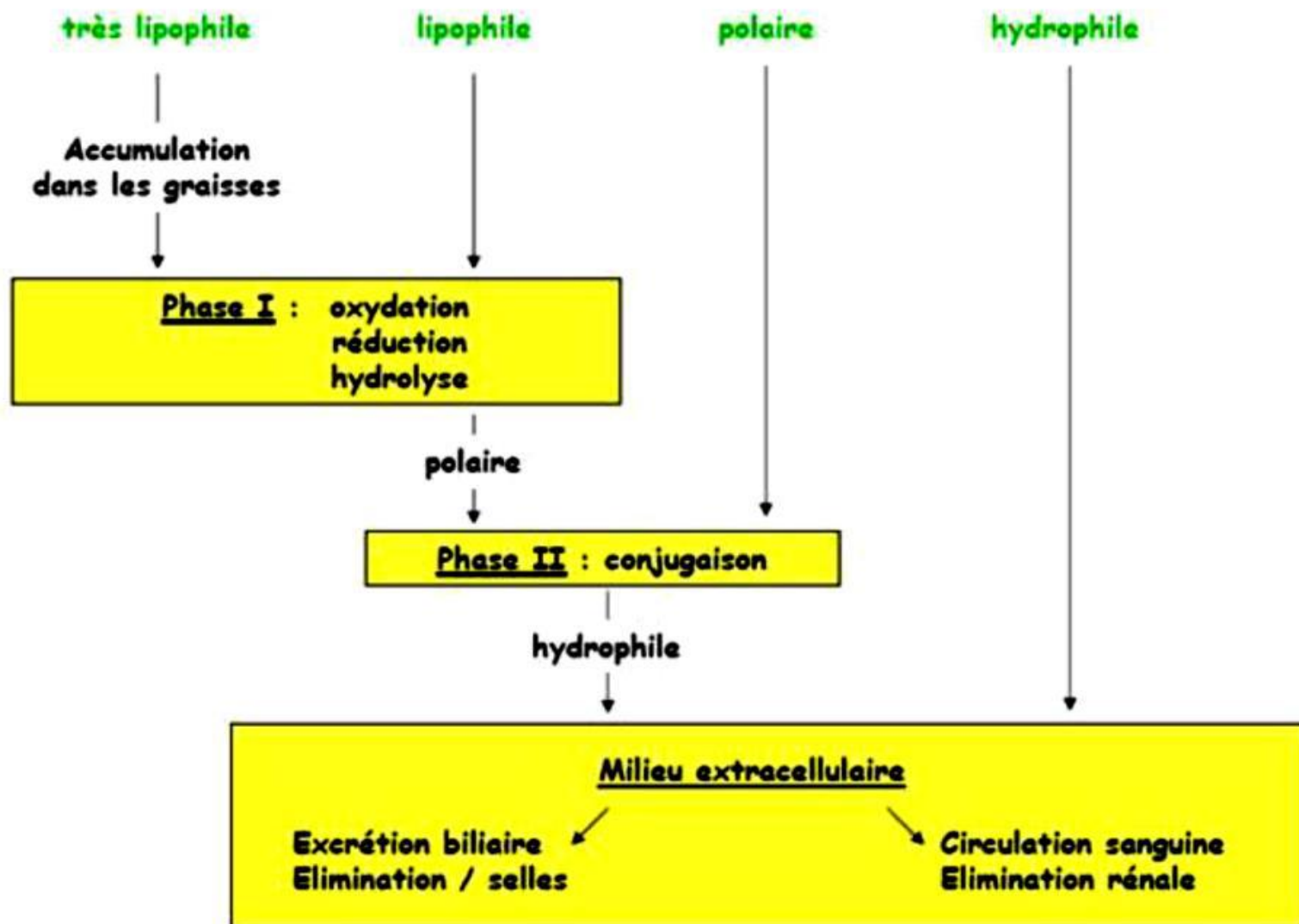
sont ***des enzymes de fonctionnalisation*** : oxydations, des réductions ou des hydrolyses

Qui rendent les molécules plus polaires (par hydroxylation ou désalkylation par exemple).

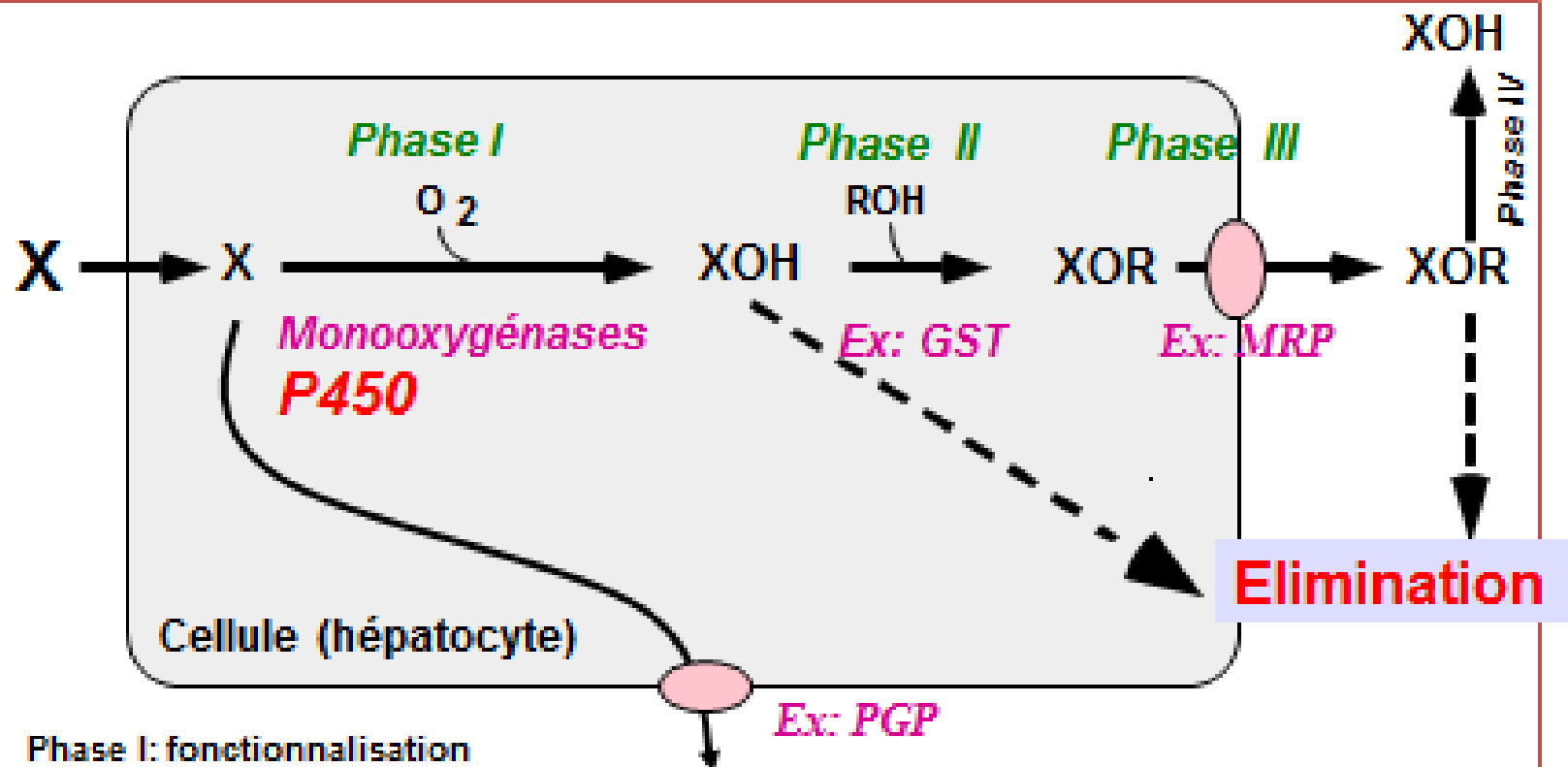
Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 catalysent la grande majorité des réactions de phase I



Selon xénobiotique :



# Métabolisme des xénobiotiques



Phase I: fonctionnalisation

Phase II: conjugaison (+ hydrophile)

Phase III: expulsion de conjugués ou du produit parent (ex: mdr, MRP)

 : expulsion du xénobiotique inchangé ou conjugué

## 2) les enzymes de phase II

sont des transférases qui catalysent des réactions de conjugaison, et rendent les métabolites encore plus hydrophiles  
***dites de conjugaison***

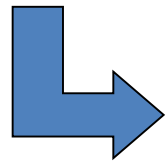
Enfin, pour être éliminés hors de la cellule, ces métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane par des protéines de phase III

(P-glycoprotéine ou Pgp)  
( multidrug resistance proteins ;MRP...)

Comme pour toutes les protéines de l'organisme, la qualité et la quantité des enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation des médicaments dépendent majoritairement de l'information portée par le gène qui les code.

Or, ces gènes peuvent présenter des différences de séquences (ou polymorphismes) tels que:

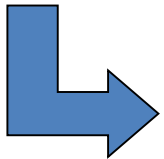
# Polymorphisme génétique et génotypage



**SNP (single nucleotide polymorphism )**



**variations de base  
dans un nucléotide**



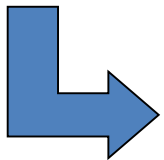
**polymorphismes de répétition**



**minisatellites**



**microsatellite**



**délétions ou amplifications du gène**

Les polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme des médicaments s'expriment dans la population générale sous la forme de différents phénotypes métaboliques

d'individus dits **métaboliseurs limités ou lents**  
(déficit d'activité enzymatique)

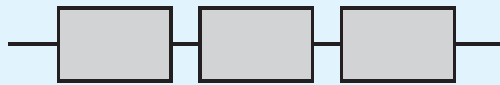
**métaboliseurs extensifs ou rapides**  
(activité enzymatique normale).

L'existence **de métaboliseurs dits ultrarapides** (activité enzymatique augmentée)

ou intermédiaires (activité enzymatique réduite) est également reconnue pour certaines enzymes polymorphes

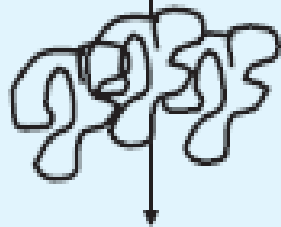


Gène dupliqué ou amplifié



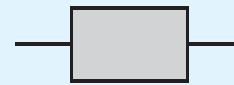
ARNm-AAAA  
ARNm-AAAA  
ARNm-AAAA

Enzyme  
« surexprimée »



Métabolisme augmenté  
ou ultrarapide

Gène normal ou muté



ARNm-AAAA

Enzyme  
à spécificité  
altérée



Autres métabolites  
formés

Enzyme  
normale



Métabolisme  
normal

Enzyme  
instable



Métabolisme  
réduit

Gène délété

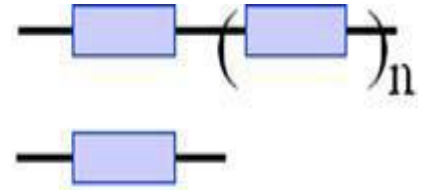
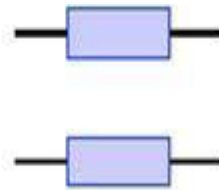
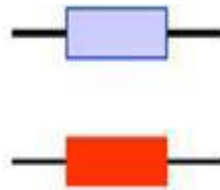
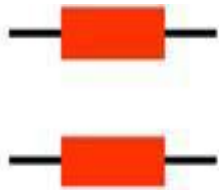


X

Enzyme  
absente

X

Métabolisme  
déficitaire



↓  
Pas de gène actif

↓  
1 gène actif

↓  
2 gènes actifs

↓  
Plus de 2 gènes actifs

Métabolisme  
**Lent**

Métabolisme  
**Intermédiaire**

Métabolisme  
**Rapide**

Métabolisme  
**Ultrarapide**



Gène défectueux (délétion, mutation inactivatrice)



Gène actif

**Le typage pharmacologique :**

L'activité de ces enzymes est variable d'un individu à l'autre et elle est transmise de façon mendélienne.

Deux approches méthodologiques sont utilisées pour déterminer la capacité métabolique d'un individu vis-à-vis d'une enzyme donnée :

***le phénotypage*** et ***le génotypage***.

# Méthodes de détermination du phénotype et du génotype

## PHENOTYPAGE

mesure directe de l'activité enzymatique le plus souvent sur l'administration d'un substrat-test (en général un médicament), suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduelles et/ou de leurs métabolites

## GENOTYPAGE

identification directe des anomalies génétiques à l'origine de la variabilité d'expression et d'activité de l'enzyme étudiée.

(PCR-RFLP ou PCR-digestion enzymatique (quand la mutation crée ou abolit un site de restriction), ou Allèle spécifique-PCR.....)

# **Applications cliniques de la pharmacogénétique**

## Exemple le polymorphisme de la TPMT ou thiopurine S méthyl transférases

Les thiopurines sont des analogues de l'hypoxanthine qui inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN.

L'azathioprine est la thiopurine la plus utilisée dans les greffes de moelle et au cours des maladies auto-immunes

Elle est transformée dans l'organisme en  
6-mercaptopurine.



La 6-mercaptopurine. est un métabolite très particulier qui suit 2 principales voies,

- ✓ elle est métabolisée en **6 thioguanine (6TGN)** le produit actif = effet immunosuppresseur mais toxique en fonction de sa concentration,
- ✓ d'autre part en en un métabolite méthylé la **6 methyl mercaptopurine ( 6 MMP )** inactif mais toxique

Par une 3ème voie en xanthine oxydase inactive.

Azathioprine



6-Mercaptopurine (6-MP)

**TPMT**



6-MMP

**HGPRT**

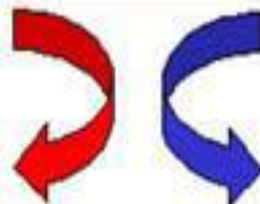


6-Thioguanines

**XO**



Acide thiourique



Toxiques

Actifs

L'activité de la TPMT est génétiquement déterminée

*un enfant qui a une activité TPMT nulle va avoir besoin de doses faibles de médicament, une posologie normale pouvant avoir de graves conséquences par accumulation de 6 thioguanine toxique myélo-suppresseur = une aplasie durable avec un seul comprimé de 6MP.*

*Les patients ayant une activité TPMT élevée produisent des taux bas de 6TG ,il faut des doses élevées de 6MP pour obtenir la concentration de 6 thioguanine compatible avec un effet anti leucémique d'où risque de complication infectieuse*

La connaissance du profil génétique du patient permet un ajustement individuel du médicament et ou de sa posologie .

Les médicaments seront utilisés de façon plus efficace et avec un moindre risque pour le patient.

Merci  
Pour votre  
Attention