REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE D'ALGER 1
FACULTE DE MEDECINE D'ALGER

2ème ANNEE MEDECINE

CYCLE Préclinique

MODULE DE GENETIQUE

THÉRAPIE GÉNIQUE

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019/2020

Auteur : **Pr RAAF N B**

PLAN

Introduction
I. Définition/considérations historiques
II. Etapes de la thérapie génique
1. Thérapie Génique IN VIVO
2. Thérapie Génique EX VIVO
III. Systèmes de transfert
1. Vecteurs viraux
2. Systèmes de transfert non-viraux (vecteurs non-viraux)
3. Utilisation d'un transgène
IV. Applications de La Thérapie Génique Au Traitement Des Maladies
Conclusion
Références bibliographiques

Objectifs pédagogiques

Au terme de ce cours, l'étudiant doit être capable de :

- Définir la thérapie génique.
- Enumérer les principales stratégies de thérapie génique.
- Préciser l'intérêt de la thérapie génique.

Introduction

De nouvelles méthodes de thérapies géniques permettent de traiter, et même de plus en plus souvent de soigner des maladies génétiques jusqu'alors incurables et mortelles. Peu de temps après la découverte des différents gènes dit monogéniques la communauté médicale et scientifique s'est rapidement enthousiasmée pour le développement et la mise en place d'essais cliniques en thérapie génique dans l'espoir de corriger une activité génétique défaillante. On constate aujourd'hui un développement de nouveaux vecteurs dérivés de lentivirus et d'AVV, plus efficaces et plus sécurisés, qui permet l'aboutissement prometteur de plusieurs essais cliniques de traitements de diverses pathologies comme l'hémophilie, l'adrénoleucodystrophie, l'amaurose de Leber ou le cancer, Cela est source d'espoir pour des millions de personnes atteintes de maladies génétiques.

I. Définition/considérations historiques

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).

La technique de transfert génétique *in vitro* est maitrisée dans les années 80. La recherche en thérapie génique se tourne donc en premier lieu vers les syndromes d'immnuodéficience 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 utilsés 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 adénoside déaminase qui est une enzyme nécessaire au métabolisme des purines.

Les recherches en thérapie génique se portent après vers d'autres vecteurs afin de mieux contrôler le lieu d'insertion du transgène. Aujourd'hui, la thérapie génique est appliquée à de nombreuses maladies, 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. Il faut choisir le type de modification à apporter au génome, les modalités d'administration ainsi que le vecteur qui transportera la cassette génétique.

II. Etapes de la thérapie génique

Le pré-requis pour pouvoir envisager d'utiliser la thérapie génique pour traiter une maladie est d'avoir identifié le gène qui en est responsable.
Il faut ensuite isoler en laboratoire un gène normal, fonctionnel, et c'est celui-ci qui servira de « gène médicament ».
Puis il faut construire un véhicule que l'on appelle un « vecteur » qui permette de transporter ce gène médicament de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule malade car il ne peut pas y entrer spontanément.
Il faut ensuite s'assurer de l'efficacité et de l'absence de toxicité du produit dans des modèles animaux de la maladie.
L'étape ultime est de produire la protéine manquante dans les cellules du malade.
Le concept de thérapie génique est déjà ancien, puisqu'il est né au début des années 1970 lorsque des scientifiques (Rogers, puis Friedmann et Roblin) ont évoqué la possibilité d'utiliser de l'ADN exogène pour remplacer un ADN défectueux chez des personnes atteintes de défauts génétiques. Cette idée s'est concrétisée sur le plan expérimental et a conduit à un premier essai clinique de thérapie génique en 1990 dans le cadre d'une maladie du système immunitaire (ADA-SCID, essai mené par l'équipe du Dr. Anderson aux États-Unis). Mais il a fallu attendre l'an 2000 pour aboutir au premier succès mondial de thérapie génique, toujours pour une maladie immunitaire (X-SCID, essai mené par l'équipe du Pr. Fischer en France).
Ce concept de thérapie génique a été initialement destiné aux maladies génétiques monogéniques, dans lesquelles des mutations causales dans un gène donné sont responsables de la maladie que présente le patient.
Par la suite cette approche a été étendue sur le plan expérimental à d'autres maladies notamment des maladies polyfactorielles (avec des applications envisagées notamment en cancérologie ou pour les maladies infectieuses).
A ce jour, plus de 1700 essais cliniques ont été répertoriés dans la « Journal of Gene Medecine Trial Database » (http://www.abedia.com/wiley) à travers le monde (surtout des essais de phase I), en majorité dans le domaine de la cancérologie (plus de 60% de la totalité des essais), mais également dans les maladies monogéniques (8% des essais).
Théoriquement, la thérapie génique peut s'envisager selon différentes modalités. Tout d'abord, il faut souligner que la thérapie génique chez l'homme n'est pas envisageable sur des cellules germinales. Effectivement ceci correspondrait à l'introduction d'une modification génétique au niveau de cellules souches embryonnaires ou de cellules germinales, donc l'introduction de modifications transmissibles à la descendance.
Ceci pose tout d'abord des problèmes techniques, mais surtout une problématique importante sur le plan éthique (implication d'une telle approche sur la modification ou l'amélioration de l'espèce, etc.). On peut noter cependant que cette approche est couramment utilisée chez l'animal où elle est appelée transgénèse : le transfert de gènes dans des cellules souches embryonnaires ou des cellules germinales chez l'animal est utilisé notamment pour la création de modèles animaux de pathologie, pour la production de substances pharmacologiques (création de « bio-réacteurs »), ou encore pour des implications agro-alimentaires.
La thérapie génique germinale n'est donc pas envisageable chez l'homme. Par contre, la thérapie génique sur des cellules somatiques a pu être envisagée selon différentes modalités : la thérapie génique in vivo et la thérapie génique ex vivo (figure 1).

1.Thérapie Génique IN VIVO

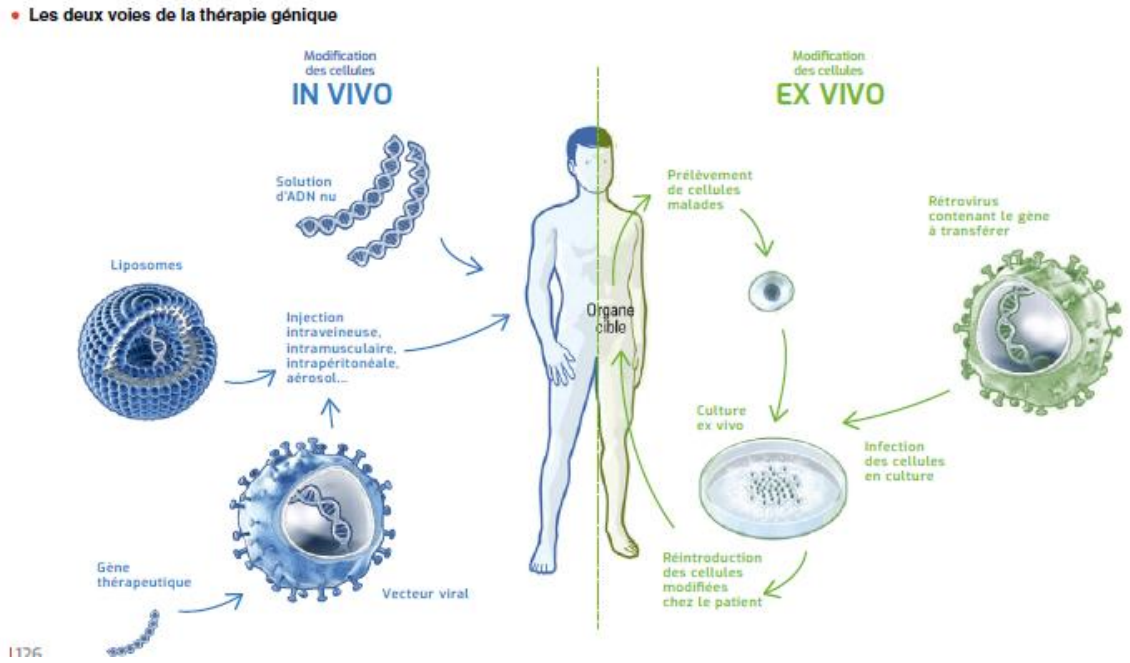
La thérapie génique in vivo consiste en un transfert de gènes direct, soit par injection systémique dans la circulation sanguine, soit par injection locale au niveau d'un tissu ou organe. On peut citer comme exemple ici le transfert de gènes direct par injection au niveau de la rétine, dans les approches de thérapie génique de certaines maladies génétiques affectant la vision.
Un autre exemple est celui des dystrophies musculaires d'origine génétique, dans lesquelles l'objectif pourrait être d'effectuer un transfert de gènes dans différents muscles et ceci par injection directe dans le muscle, ou par injection dans la circulation sanguine.

2. Thérapie Génique EX VIVO

La deuxième modalité de transfert de gènes est la thérapie génique ex vivo. Cette approche comporte d'abord une étape de prélèvement de cellules chez l'individu à traiter. Ces cellules seront mises en culture, et on pourra alors effectuer le transfert de gènes sur les cellules en culture. Les cellules modifiées par le transfert de gènes pourront alors être réimplantées chez l'individu. Cette approche de thérapie génique ex vivo est développée actuellement notamment pour le transfert de gènes dans des cellules souches adultes.
L'objectif est alors d'effectuer un transfert de gènes unique sur des cellules souches prélevées chez un individu. Ces cellules souches seront dont modifiées par le transfert de gènes, puis réimplantées dans l'individu. Puisque les

cellules souches ont des capacités d'auto-renouvellement cette approche permet théoriquement d'effectuer un transfert de gènes unique et stable. Les cellules matures formées par la différenciation de ces cellules souches porteront la modification génétique introduite, permettant ainsi dans le cadre des maladies monogéniques la correction du défaut génétique. Cette approche a été utilisée avec succès sur le plan expérimental et même dans certains essais cliniques, notamment visant des cellules souches hématopoïétiques dans le cadre de différentes maladies génétiques touchant les constituants du sang (certains déficits immunitaires, hémoglobinopathies).
Toutes les approches de thérapie génique sont basées sur la notion de transfert de gènes, qui consiste à transférer un acide nucléique exogène dans une cellule porteuse d'une anomalie génétique. Au final, ce transfert de gènes a pour objectif de permettre la correction de l'anomalie génétique au niveau de la cellule et ainsi de rétablir une fonction cellulaire normale.

FIGURE 1



III. Systèmes de transfert :

Le transfert de gènes s'effectue grâce à un outil appelé vecteur, qui permettra de transférer dans la cellule une séquence codante (transfert de « transgène »), ou des séquences modifiant l'expression de certains gènes présents au niveau de la cellule.
En fonction des pathologies à soigner ou des cellules ciblées, on utilise différents types de vecteurs regroupés en vecteurs de type viral et les systèmes de transfert non-viraux (ou vecteurs non-viraux).

1. Vecteurs viraux

Les différents types de vecteurs viraux ont été développés à partir de virus sauvages rendus non réplicatifs par modification de leur génome. Les virus sauvages naturels ont développé au cours de millions d'années d'évolution des systèmes très efficaces de transfert de gènes, puisque le cycle viral implique le transfert du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Ainsi, le principal avantage des vecteurs viraux est l'efficacité du transfert de gène, puisque le mode d'infection propre au virus sauvage est conservé.
Tous les vecteurs viraux posent néanmoins des problèmes de toxicité et/ou d'immunogénicité.
De nombreux types différents de vecteurs viraux ont été développés, chaque type ayant des avantages et inconvénients particuliers, et notamment la spécificité du vecteur pour le transfert de gène dans un type cellulaire donné ; la taille plus ou moins grande de la séquence pouvant être transférée ; la stabilité ou non du transfert de gène en fonction de l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule hôte, ou au contraire la perte du vecteur au cours de la réplication cellulaire ; on encore la toxicité spécifique du type de vecteur. A ce jour, les plus fréquemment utilisés sont les vecteurs rétroviraux, les vecteurs lentiviraux, les vecteurs adénoviraux et les vecteurs adénoassociés.

a/ Les rétrovirus : sont utilisés comme vecteur en thérapie génique car ils permettent d'insérer la nouvelle information génétique dans le génome de la cellule cible. Le nouveau gène se transmet alors de cellules mères en cellules filles de manière égale sans « dilution » de l'information génétique dans le temps. Le génome des rétrovirus est composé de molécules d'ARN (acide Ribonucléique) et non d'ADN comme le génome des cellules humaines. L'infection par un rétrovirus implique une étape de rétrotranscription de l'ARN en un fragment d'ADN qui pourra

être associé (étape d'intégration) aux chromosomes après pénétration dans le noyau cellulaire. Une combinaison de protéines virales et de protéines de la cellule cible assure cette étape de transfert des molécules d'ADN du cytoplasme cellulaire vers le noyau et l'intégration dans le génome de l'hôte. Une fois intégré, le génome du rétrovirus sous sa forme ADN est stable et transmis de manière mendélienne comme n'importe quel gène de la cellule.
Si la plupart des essais cliniques ont été réalisés avec des vecteurs dérivés de rétrovirus de souris, certains essais cliniques sont actuellement en cours utilisant des vecteurs dérivés du virus VIH (traitement de l'adrénoleucodystrophie par l'équipe Cartier-Aubourg 2007, traitement de l'infection à VIH aux États-Unis depuis 2000, traitement d'hémoglobinopathies par l'équipe Leboulch-Beuzard). Ce dernier type de vecteur, dit lentiviral, dérivé d'un virus humain mais totalement sécurisé, est un vecteur particulièrement en vogue. En effet, il est capable de modifier génétiquement des cellules au repos, ouvrant ainsi des possibilités de manipuler par des neurones, des cellules hépatiques.
L'intégration des vecteurs rétroviraux dans le génome de la cellule cible, si elle est un atout majeur pour la pérennisation et la transmission de l'information génétique, représente néanmoins une difficulté en matière de sécurité. Deux essais cliniques utilisant les vecteurs rétroviraux murins pour modifier les cellules hématopoïétiques (traitement de l'immunodéficience liée à une mutation portée par la chaîne gamma-c du récepteur à l'interleukine-2, et traitement de la maladie de Gaucher) ont conduit à l'apparition de formes de leucémies chez les patients.

b/ Les vecteurs dérivés de virus adéno-associés, ou AAV (pour adeno associated virus) : sont des vecteurs permettant le transfert de petites unités d'expression génétique. Majoritairement, ce transfert se fait sans intégration à l'ADN de la cellule hôte. Le virus natif est capable d'intégrer le génome de la cellule hôte, toujours au même endroit dans le chromosome. Une insertion non contrôlée pouvant entraîner d'importants désordres dans la fonction cellulaire, ces vecteurs ont été fortement développés pour leur potentiel sécuritaire bien qu'ils ne soient capables que de transférer des petits gènes. Bien que la construction du vecteur à partir du virus élimine cette propriété de ciblage de l'insertion, les vecteurs dérivés des AAV ont été beaucoup utilisés sur le plan clinique. Longtemps considérés comme inoffensifs, à l'inverse des vecteurs adénoviraux et rétroviraux, les vecteurs dérivés de l'AAV ont connu un fort développement. À noter que les vecteurs dérivés des AAV ont été testés dans de nombreuses approches thérapeutiques avec des succès obtenus, notamment entre 2007 et 2010, lors d'essais de traitements d'une forme d'Amaurose congénitale de Leber de modèles animaux canins et finalement de jeunes patients. En 2013, le vecteur de type AAV apparait comme un vecteur intéressant dont le développement de l'utilisation dans les prochaines années est prévisible.

2. Systèmes de transfert non-viraux (vecteurs non-viraux)
Les systèmes de transfert de gène non viral sont basés sur des méthodes physicochimiques.
De nombreux procédés ont été développés, basés sur le transfert d'acides nucléiques « nus », ou associés à des composés chimiques (surtout lipidiques ou peptidiques) dans le but de stabiliser les acides nucléiques et de faciliter le passage membranaire et le cheminement vers le noyau des cellules cibles. Ces acides nucléiques, « nus » ou associés à des composés chimiques, pourront être délivrés dans l'organisme soit directement par injection (locale ou systémiques), soit couplé à l'utilisation de procédés physiques comme l'électroporation ou l'utilisation de champs magnétiques.
Les méthodes de transfert génique non viral présentent un risque de toxicité réduit, mais aussi une efficacité inférieure par comparaison à un transfert viral.
Les différents types de vecteurs permettent donc le transfert d'acides nucléiques exogènes dans une cellule porteuse d'une anomalie génétique. Dans l'objectif de corriger cette anomalie, les principales stratégies développées sont basées sur l'utilisation d'un transgène, ou sur la modulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes présents au niveau de la cellule.

3. Utilisation d'un transgène
La première stratégie principale pour la thérapie génique est d'utiliser un transgène, c'est-àdire une séquence codant un ARNmessager d'intérêt. Ce transgène correspond idéalement à la totalité de la séquence codant la protéine d'intérêt, associée à des séquences régulant l'expression de ce transgène (il s'agira si possible des éléments régulateurs naturels du gène d'intérêt, ou à défaut d'autres séquences régulatrices).
En effet, dans les maladies monogéniques, l'objectif du transfert d'un transgène est de corriger l'anomalie génétique causée par les mutations du gène impliqué. Afin de restaurer l'expression d'une protéine fonctionnelle, des copies normales de la séquence codante du gène impliqué sont transférées dans les cellules cibles porteuses du déficit génétique.
Puisque l'expression thérapeutique du transgène doit conduire à la synthèse dans la cellule d'une protéine à des niveaux thérapeutiques, c'est-à-dire ni en trop faible quantité, ni en excès, une régulation précise du niveau

d'expression est alors requise : celle-ci doit reproduire le plus fidèlement possible l'expression de la protéine sauvage dans le tissu d'intérêt. Avec les systèmes de transfert disponibles actuellement, cela n'est que partiellement réalisable, notamment en raison de contraintes liées à la taille du transgène, qui est limitée en fonction du vecteur utilisé. Il reste ainsi souvent difficile de recréer les conditions de régulation reproduisant parfaitement les situations physiologiques.

IV. Applications de la Thérapie Génique au Traitement des Maladies

Parmi les 1 470 essais cliniques en thérapie génique menés dans le monde en 2008, 65% concernent les cancers, 8% les maladies monogéniques, 9% les maladies cardiovasculaires et 7,5% maladies infectieuses.

Les premières maladies ayant bénéficié de thérapies géniques sont les pathologies touchant le système immunitaire« bébés bulles », Le premier traitement a eu lieu en 1999.

Vingt malades avaient été traités avec des résultats très encourageants puisque 18 enfants sont en vie aujourd'hui, dont 17 avec un système immunitaire qui fonctionne. C'est donc la preuve que la thérapie génique peut corriger une maladie génétique sur la durée.

Aujourd'hui, les technologies se développent et les principales applications concernent un certain nombre de maladies génétiques du sang, de l'oeil, du foie et les maladies neuro-musculaires mais aussi des maladies qui ne sont pas d'origine génétique comme des cancers. À ce jour, 3 médicaments ont été récemment commercialisés.

Maladie avec un gène muté : stratégie phare de la thérapie génique

La « réparation » d'une activité génétique est envisagée ou a été testée sur le plan clinique dans de nombreuses pathologies. Certaines immunodéficiences liées à des déficits dans le gène codant l'Adénosine Déaminase, ou dans celui codant la chaîne gamma-c du récepteur à l'Interleukine-2 ou les béta-thalassémies (premier grand succès en 2010). Les hémophilies de type A et B sont respectivement associées à des défauts de production des facteurs VIII et IX de la chaîne de coagulation qui pourraient être produites par des cellules musculaires ou hépatiques libérant ces facteurs dans le sang.

Le traitement de la mucoviscidose est envisagé par l'expression du gène codant le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) par certaines cellules pulmonaires.

Cécité, précoce une dégénérescence précoce de la rétine d'origine génétique peut aujourd'hui être soignée par thérapie génique. Un vecteur reposant sur un virus adéno-associé (AAV) et portant la version saine du gène pathologique est directement injecté dans la rétine. La qualité de vie des jeunes patients peut ainsi être considérablement améliorée.

Maladie de Hunter, la première thérapie génique recourant à des ciseaux génétiques (nucléase à doigt de zinc) a été réalisée directement dans l'organisme en novembre 2017. Un gène défectueux empêche la production d'une enzyme essentielle pour le métabolisme.

Avec la thérapie génique, le gène sain et les ciseaux génétiques sont empaquetés dans un vecteur viral (AAV) et injectés dans la circulation sanguine du patient. Les virus parviennent alors au foie du patient afin d'y corriger le gène défectueux. La thérapie semble sûre.

ARNi : désigne l'ARN interférent. Il s'agit d'un mécanisme cellulaire naturel capable de mettre en sommeil certains gènes. La thérapie génique tire parti de ce mécanisme pour inhiber les gènes responsables de la maladie. La première thérapie génique par ARNi a été autorisée en août 2018 pour le traitement d'une maladie du système nerveux périphérique. Une mutation du gène TTR dans le foie entraîne l'accumulation de protéines anormalement modifiées dans les organes et les tissus. Il peut en résulter des lésions du système nerveux périphérique. L'ARNi est injecté aux patients sous la forme d'un complexe lipidique et met en sommeil le gène TTR dans les cellules du foie. Cela empêche l'accumulation de protéines indésirables dans les organes et les tissus du patient et améliore sa qualité de vie.

.

Conclusion

Les Possibilités et les risques liés aux nouvelles thérapies géniques sont nombreuses. Les obstacles que doivent encore surmonter ces nouvelles thérapies sont nombreux également, les études prospectives actuelles dans le monde suscitent beaucoup d'espoir.

Références bibliographiques

Thérapie génique en 2017 : état des lieux et perspectives, Nathalie Lannoy louvain med 2017; 136 (1): 1-8
Perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques, Martin Krahn et Nicolas Lévy Université Médicale Virtuelle Francophone 2017
Thérapies Cellulaires Et Géniques Octobre 2018, SCIENCE ACTUELLE
Thérapie Génique : Intérêt Et Limites Des Outils, Jacques MALLET Bull. Acad. Vét. France — 2013 - Tome 164 - N°1