

UE 1B :
Biomolécules, génome, bioénergétique,
métabolisme

ACTUALISATION
Fiche de cours n°23

Thérapie cellulaire et thérapie génique

- ★ Notion tombée 1 fois au concours
- ★★ Notion tombée 2 fois au concours
- ★★★ Notion tombée 3 fois ou plus au concours

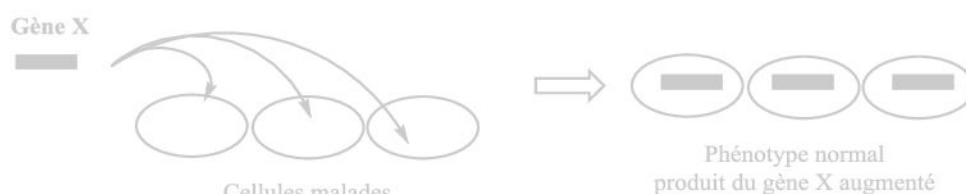
DEFINITIONS

- Introduction de **cellules normales** au malade
- Inconvénients :
 - Disponibilité du greffon
 - Compatibilité immunitaire notamment **système HLA des donneurs** : il existe un **risque de rejet**
- Exemples :
 - ~~Greffe de moelle osseuse~~
 - ~~Reconstitution d'un tissu épidermique des grands brûlés~~

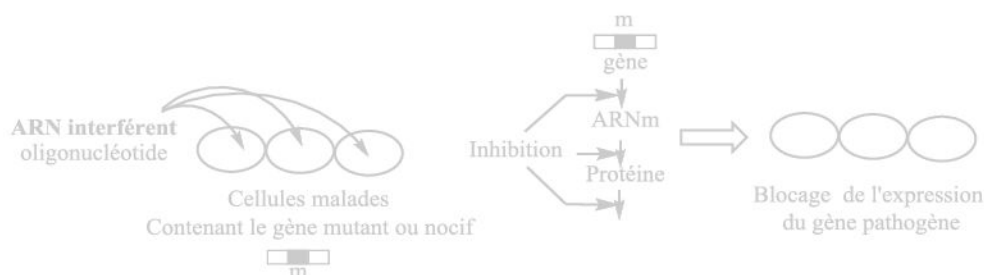
- **Modification génétique des cellules de l'individu dans le but de combattre une maladie**
- **Avantages** : on peut utiliser les propres cellules du patient. Pas de risque immunitaire
- **Problème : contrôler le gène réintroduit**
- La **modification** peut se faire :
 - **Ex vivo** : autogreffe de cellules génétiquement modifiées:
 - Prélèvement initial des cellules
 - Culture des cellules et introduction d'un transgène qui modifie les cellules
 - Puis réimplantation des **cellules génétiquement modifiées au patient**
 - **Contraintes de stérilité forte**
 - **La plus réalisée actuellement**
 - ~~Application en hématologie : maladies des globules rouges, ou maladies de la peau~~
 - **In vivo** c'est-à-dire introduction d'un vecteur directement dans l'organisme
 - Par intraveineuse
 - Par le tractus trachéo-bronchique : mucoviscidose, par aérosol
 - Par les cellules du SNC
 - Par les cellules musculaires
 - **Stratégie la plus intéressante mais la plus complexe à appliquer**

STRATEGIES GENERALES DE LA THERAPIE GENIQUE

- C'est la plus simple et plus ancienne
- Utilisée lorsque la maladie provient d'une protéine déficiente
- On apporte le gène normal via un vecteur à la cellule qui peut à nouveau exprimer la protéine.



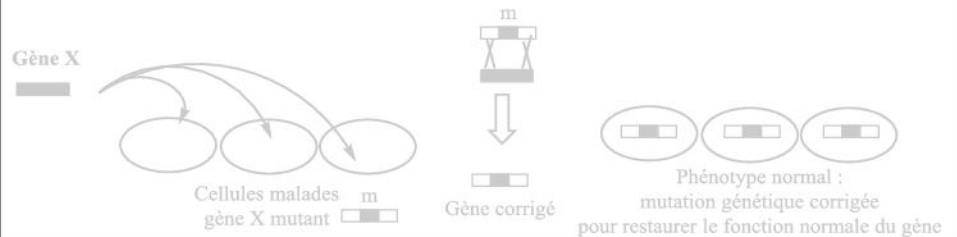
- Méthode plus complexe
- Utilisée si le **produit du gène déficient est nocif** : ~~c'est le cas des maladies génétiques dominantes~~
- On injecte des **ARN interférents double brins** qui s'associent au complexe RISC
- Un seul brin est gardé et le complexe RISC **interfère avec l'ARNm** du gène nocif et le coupe, ce qui **inhibe son expression**



STRATEGIES GENERALES DE LA THERAPIE GENIQUE (SUITE)

Principe
général

- C'est la méthode idéale, longtemps impossible à réaliser
- Il s'agit de **corriger directement la copie du gène muté dans le génome pour corriger à la base près le génotype**
- On utilise la **recombinaison homologue**, phénomène rare à efficacité faible, **et des difficultés de ciblage**



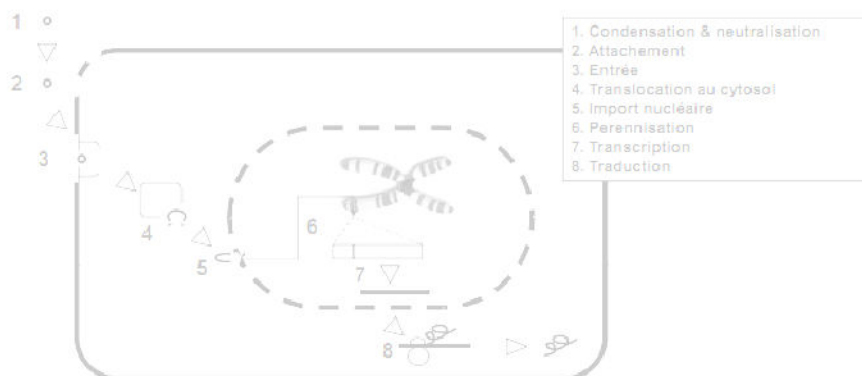
Technique de
recombinaison
homologue
dirigée

- **Meilleure efficacité**
- Pour faciliter la recombinaison homologue, l'ADN est cassé au niveau de la **mutation** par cassure double brin grâce à une nucléase **et on apporte ensuite la région normale**
- Réparation par recombinaison homologue (RH) avec une séquence correctrice donneuse
- **La spécificité de la coupure est apportée par la méthode dite "CRISPR-Cas9":**
 - Système de défense découvert chez les bactéries servant à cliver les ADN étrangers à la bactérie
 - Il est composé d'un **ARN simple brin guide** qui s'hybride sur l'ADN cible de façon complémentaire
 - Cet ARN est associé à une **nucléase Cas9** capable de provoquer une cassure double brin
 - Le principe est de choisir la séquence complémentaire de la cible permettant une coupure spécifique à un endroit précis du génome



- **Utilisation de deux systèmes de réparation en fonction du type de modification recherché :**
 - Utilisation de la jonction des extrémités non homologue (NHEJ), sans apport d'ADN donneur, permet **d'invalider le gène**
 - Utilisation de la **recombinaison homologue**, avec apport d'un ADN donneur, permet **de corriger le gène**

LES VECTEURS DE TRANSFERT DE GENES



1. Condensation de l'ADN et neutralisation des charges
2. Le vecteur s'attache à la cellule
3. Entrée dans la cellule
4. Translocation au cytosol
5. Import nucléaire
6. Intégration dans le génome : **pérennisation**
7. Transcription du gène
8. Traduction en protéine thérapeutique

LES VECTEURS NON VIRALIS

- **Lipides cationiques ou liposomes**
 - **Molécules amphiphiles** comportant
 - une **tête polaire cationique** ⚡ reliée par un lien chimique ou spacer
 - à une **queue hydrophobe** ⚡
 - Interaction entre les groupes phosphates négatifs de l'ADN et les têtes polaires chargées + : **condensation de l'ADN** : compaction pour entrer dans la cellule.
-
- **Polymères cationiques**
 - Ils résultent de l'association d'un **polymère et d'un acide nucléique**
 - Le polymère le plus efficace est le **polyéthylène imine** ⚡ (PEI)
 - Interaction entre les groupes phosphates négatifs de l'ADN et les polymères chargés + : **condensation de l'ADN**
-
- Le vecteur entre par **endocytose** dans la cellule à travers une **glycoprotéine membranaire anionique**
 - L'ADN sort des endosomes
 - Une partie de l'ADN se **localise dans le noyau** pour avoir sa fonction
-
- **Avantages** :
 - Non immunogène ⚡
 - Simple à produire dans le cadre de bonne pratique pharmaceutique ⚡
 - Transfert d'un ADN de grande taille
 - Pas ou peu de risque oncogénique ⚡
 - **Inconvénients** :
 - Faible efficacité de transfert de gène
 - Expression transitoire : absence d'intégration dans le génome ⚡⚡⚡

LES VECTEURS VIRAUX	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vecteurs rétroviraux = dérivés de rétrovirus : virus à ARN <ul style="list-style-type: none"> ○ Vecteurs oncorétroviraux ○ Vecteurs lentiviraux ▪ Vecteurs dérivés de virus à ADN <ul style="list-style-type: none"> ○ Adénovirus ○ AAV
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Les vecteurs viraux proviennent de virus qui ont été modifiés : ils ont perdu leur capacité de réplication et de synthèse de nouvelles particules virales après infection ▪ Ils ne peuvent pas se propager : ils sont défectifs pour la réplication ☹ ▪ Au lieu de produire des gènes et particules virales, ils vont produire des protéines d'intérêt

LES VECTEURS VIRAUX		
LES RETROVIRUS		
		<ul style="list-style-type: none">▪ Les rétrovirus sont des virus à ARN▪ Ils sont formés d'une capside avec 2 molécules d'ARN virales à l'intérieur▪ La capside est entourée d'une enveloppe sur laquelle des glycoprotéines d'enveloppe permettent de reconnaître les récepteurs cellulaires▪ Le virus se fixe sur ce récepteur et libère ses 2 ARN dans le cytosol▪ Les ARN sont transformés en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse RT▪ Cet ADN s'intègre dans le génome▪ Les protéines virales ainsi que l'ARN viral sont produits alors par la cellule▪ De nouveaux virus sont encapsidés et sortent de la cellule
	Production d'un vecteur rétroviral	<ul style="list-style-type: none">▪ Pour réaliser un vecteur de thérapie génique rétroviral, on enlève les protéines de réplication▪ On remplace ces protéines par le gène de la protéine thérapeutique▪ On transfecte cette construction dans des cellules productrices qui expriment préalablement les protéines virales : cellules transcomplémentantes▪ Le vecteur viral produit est recombinant : capable de s'intégrer, mais une seule fois
	Avantages et inconvénients	<ul style="list-style-type: none">▪ Avantages :<ul style="list-style-type: none">○ Intégration chromosomique☺☺○ Efficacité de transfert de gène○ Expression à long terme☺▪ Inconvénients :<ul style="list-style-type: none">○ Capacité d'insertion limitée à 7 kb○ Nécessité d'une division cellulaire☹☹ : trop gros pour passer le noyau○ Risques oncogéniques☹ : lors d'une intégration proche du site d'initiation de la transcription d'un gène de régulation de la division cellulaire : gène devient oncogène☹☹ car soumis à augmentation de la transcription par les LTR
	Origine	<ul style="list-style-type: none">▪ Virus à ARN▪ Certains sont dérivés du HIV
	Avantages et inconvénients	<ul style="list-style-type: none">▪ Avantages :<ul style="list-style-type: none">○ Mêmes avantages☺☺ que les oncorétrovirus○ Transduction des cellules quiescentes possible : pas de division cellulaire nécessaire☺▪ Inconvénients :<ul style="list-style-type: none">○ Risques oncogéniques☹ : plus faible par rapport aux oncorétrovirus☺○ Dérivent du HIV

LES APPLICATIONS CLINIQUES

HEMATOLOGIE

	<ul style="list-style-type: none"> Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse sont capables de donner naissance à toutes les lignées cellulaires sanguines : globules blancs, rouges.... A partir d'un même précurseur, 2 tissus se forment dans la moelle osseuse : tissu myéloïde et tissu lymphoïde Ce précurseur exprime une protéine de surface : CD34 En corrigeant les cellules souches, toutes les cellules dérivées seront corrigées et la thérapie génique est efficace tout au long de la vie
	<ul style="list-style-type: none"> La moelle osseuse des patients est recueillie Les cellules souches sont purifiées grâce à un anticorps reconnaissant un antigène de surface spécifique des cellules souches : cellules CD34⁺ Les cellules sont corrigées par un rétrovirus et réinjectées dans l'organisme par voie intraveineuse
	<ul style="list-style-type: none"> Le DICS-X1 est induit par un déficit d'un gène codant pour une chaîne γC commune à 6 récepteurs d'interleukines L'utilisation d'un vecteur rétroviral possédant l'ADNc de cette chaîne permet de retrouver l'expression de ces récepteurs La prolifération des lymphocytes est restaurée chez ces patients Résultats : <ul style="list-style-type: none"> nombreuses guérisons ont été observées mais la thérapie génique a également induit des effets secondaires graves : leucémies aiguës lymphoblastiques chez 5 patients / 38 traités : risque oncogénique lié au vecteur oncorétroviral de 1^{ère} génération
	<ul style="list-style-type: none"> De nouveaux protocoles sont mis au point aujourd'hui, avec succès, en utilisant des vecteurs lentiviraux pour le traitement de : <ul style="list-style-type: none"> β-thalassémie et drépanocytose Adréno-leucodystrophie : atteinte de la gaine de myéline avec une thérapie génique touchant la moelle osseuse

LES APPLICATIONS CLINIQUES

CANCEROLOGIE

	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition d'oncogènes Immunothérapie active : approche la plus prometteuse <ul style="list-style-type: none"> Stimulation de la réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses Transfert de gène-suicide ou gène tueur Virus oncolytiques dont la réplication est limitée aux tumeurs : a été utilisée mais en perte de vitesse
--	---

CONCLUSION

	<ul style="list-style-type: none"> Les succès de thérapie génique ont tardé à venir mais sont maintenant indiscutables Les oncorétrovirus de 1^{ère} génération présentaient des effets secondaires graves comme les leucémies La nouvelle génération de vecteurs lentivirus est beaucoup plus efficace et beaucoup plus sûre L'efficacité en cancérologie et la sécurité sont en voie d'amélioration avec les virus oncolytiques ou les lymphocytes T modifiés La possibilité de modifier l'ADN à la base près avec le système CRISPR-Cas9 ouvre des perspectives considérables
--	---