

Perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Martin Krahn et Nicolas Lévy

Département de Génétique Médicale - Hôpital Timone Enfants, AP-HM,
Et INSERM UMR910 - Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université
Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Approches pharmacologiques dans les maladies monogéniques	4
I.1	Approches « pharmacogénétiques	4
II	La thérapie cellulaire	5
II.1	Cellules souches embryonnaires.....	7
II.2	Cellules souches pluripotentes induites (Induced Pluripotent Stem Cells, ou IPS).....	7
II.3	Cellules souches adultes	7
III	La thérapie génique.....	8
III.1	Thérapie génique in vivo.....	9
III.2	Thérapie génique ex vivo.....	10
III.2.1	Vecteurs viraux.....	11
III.2.2	Systèmes de transfert non-viraux (vecteurs non-viraux).....	11
III.2.3	Utilisation d'un transgène.....	12
III.2.4	Modulation de l'expression.....	13

Introduction

Dans le domaine de la génétique médicale, ces 20 dernières années ont conduit à une progression fulgurante dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques des maladies monogéniques. Malheureusement, malgré des progrès énormes dans l'identification des gènes et des études fonctionnelles permettant de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués, peu de ressources thérapeutiques sont disponibles à ce jour pour le traitement des maladies génétiques.

Comme pour tout type de maladie, la prise en charge thérapeutique des maladies génétiques peut comporter un versant **symptomatique**, visant à corriger les conséquences phénotypiques résultant du défaut génétique (comme par exemple les mesures de rééducation fonctionnelle dans les myopathies d'origine génétique, ou encore les mesures d'éducation spécialisée pour les déficiences intellectuelles d'origine génétique).

Mais, comme pour toute maladie, l'objectif définitif est une prise en charge **étiologique**, permettant d'agir directement sur la cause afin d'obtenir un effet curatif. En raison de la particularité des maladies génétiques d'être causées par une anomalie de l'ADN induisant un défaut de fonctionnement cellulaire, plusieurs approches thérapeutiques « innovantes » ont été imaginées depuis déjà plus d'une trentaine d'années : la **thérapie génique** visant à corriger directement le défaut génétique causal ; et la **thérapie cellulaire** visant à remplacer des cellules défectueuses d'un tissu.

Le concept très novateur consistant à s'attaquer aux origines génétiques et cellulaires des maladies, regroupé parfois sous le terme de biothérapies, est particulièrement séduisant dans sa linéarité théorique qui permettrait de corriger de manière ciblée l'anomalie génétique et/ou cellulaire. Néanmoins, au cours des 20 dernières années, ce concept s'est heurté à la complexité des systèmes biologiques, et les progrès tant attendus ont été moins rapides qu'espérés. Cependant, depuis quelques années, les preuves de principe expérimentales se succèdent de même que les succès thérapeutiques cliniques.

Un premier point important à retenir est que ces biothérapies feront sans aucun doute partie de l'arsenal thérapeutique contre les maladies génétiques dans les années à venir, à condition de cibler les indications et de ne jamais oublier la nécessaire évaluation du rapport risque/bénéfice pour le patient. Il faut souligner aussi que la mise en œuvre d'essais cliniques de thérapie cellulaire ou de thérapie génique est lourde en raison de contraintes réglementaires particulières.

Un deuxième point essentiel à retenir est que les approches thérapeutiques pharmacologiques sont, comme pour toute autre maladie, une piste à poursuivre pour les maladies génétiques. Effectivement, l'approche pharmacologique pour le traitement des maladies génétiques a sans doute, à tort, été délaissée. Une des raisons essentielles de ce

délaissement en est certainement l'engouement important pour les biothérapies, leur élégance théorique et les espoirs qu'elles suscitent. Une autre raison est liée aux connaissances insuffisantes des mécanismes physiopathologiques qui, à partir d'un défaut génétique dans un gène donné conduisent au défaut cellulaire, ne permettant donc pas l'identification d'une cible pharmacologique précise. La meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques et les possibilités de criblage pharmacologique à haut débit sur des modèles cellulaires ou vivants, conduisent aujourd'hui à un net regain d'intérêt pour ces approches pharmacologiques « classiques », et les succès thérapeutiques se multiplient.

L'objectif de ce chapitre sera de donner une vue d'ensemble conceptuelle des différentes approches thérapeutiques envisagées pour les maladies génétiques.

I APPROCHES PHARMACOLOGIQUES DANS LES MALADIES MONOGÉNIQUES

Classiquement, la clé pour une approche pharmacologique éventuelle est la connaissance du mécanisme physiopathologique de la maladie concernée. Les progrès très importants dans l'identification des gènes et des mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies monogéniques conduisent depuis quelques années à la caractérisation de cibles pharmacologiques potentielles (de ce point de vue, le terme « innovant » n'est donc pas à réserver aux « biothérapies » !). Des molécules actives sur ces cibles pharmacologiques peuvent alors être testées, sur des modèles cellulaires ou animaux de la pathologie. Ceci peut faire appel éventuellement à l'utilisation de plateformes de criblage pharmacologique, dans lesquelles des milliers de composés chimiques, connus ou nouveaux, peuvent être évalués. Le criblage pharmacologique à haut débit permet d'ailleurs même de chercher des composés actifs pour des maladies au mécanisme physiopathologique encore méconnu, mais à condition de disposer d'un test fonctionnel cellulaire pour mesurer l'efficacité potentielle des différentes molécules.

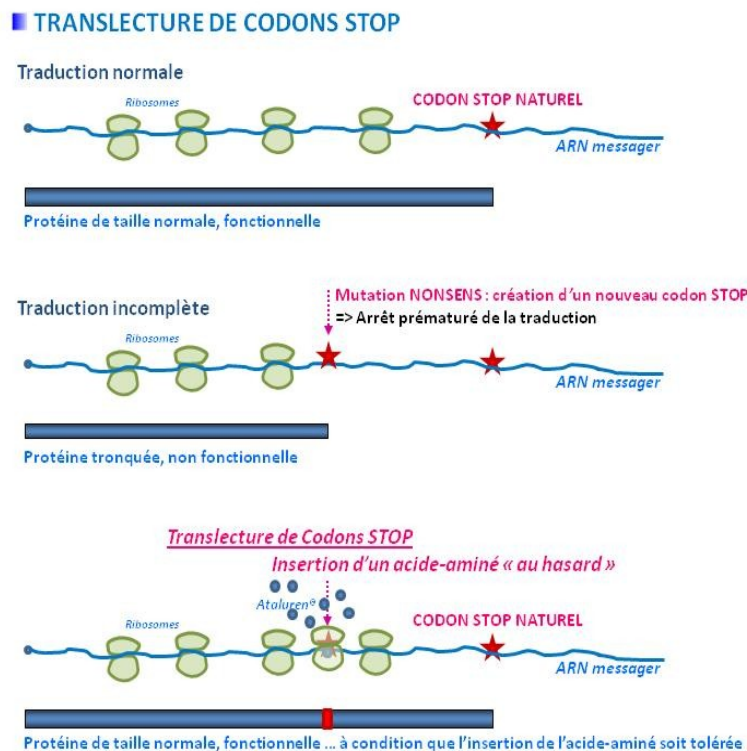
De nombreux chercheurs misent sur cette approche pharmacologique « classique », et actuellement mieux maîtrisée que les biothérapies.

I.1 APPROCHES « PHARMACOGÉNÉTIQUES

Certaines approches pharmacologiques dans les maladies génétiques ciblent aujourd'hui directement l'anomalie génétique causale (et non « seulement » les conséquences cellulaires induites). Par exemple, l'approche thérapeutique par « saut-d'exon » (détaillée dans la section « thérapie génique ») est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides qui peuvent être administrés sous différentes formes pharmacologiques, mais auront un effet direct au niveau génétique.

Une autre stratégie en cours d'évaluation est l'approche de « **translecture de codons stop** » (ou « stop-codon readthrough »). Cette approche vise à corriger les mutations de type non-sens, qui représentent 10 à 20% des mutations au niveau des gènes. Normalement, la lecture complète d'un ARNm, au cours du phénomène de traduction, permet la synthèse d'une protéine complète fonctionnelle. En cas de mutation non-sens, la traduction est interrompue prématurément, ce qui peut conduire à la synthèse d'une protéine tronquée, anormale. Par le phénomène de « translecture », induit par certaines molécules (par exemple la gentamycine, ou le PTC124-Ataluren®), un codon stop formé par une mutation non-sens peut être « corrigé » : un acide-aminé pris au-hasard sera incorporé à cet endroit au niveau de la protéine en cours de formation. Ceci permet alors la poursuite de la traduction et d'obtenir une protéine complète de longueur normale, qui peut être fonctionnelle à condition que l'incorporation de l'acide-aminé « au-hasard » soit tolérée (il ne s'agit pas forcément du bon acide-aminé au bon endroit de la protéine !).

Figure 1 : Approches pharmacogéniques



II LA THÉRAPIE CELLULAIRE

La thérapie cellulaire est définie par l'ensemble des techniques permettant la manipulation ou la transformation d'une cellule ou d'un tissu, afin de leur conférer des fonctions nouvelles, en l'occurrence thérapeutiques.

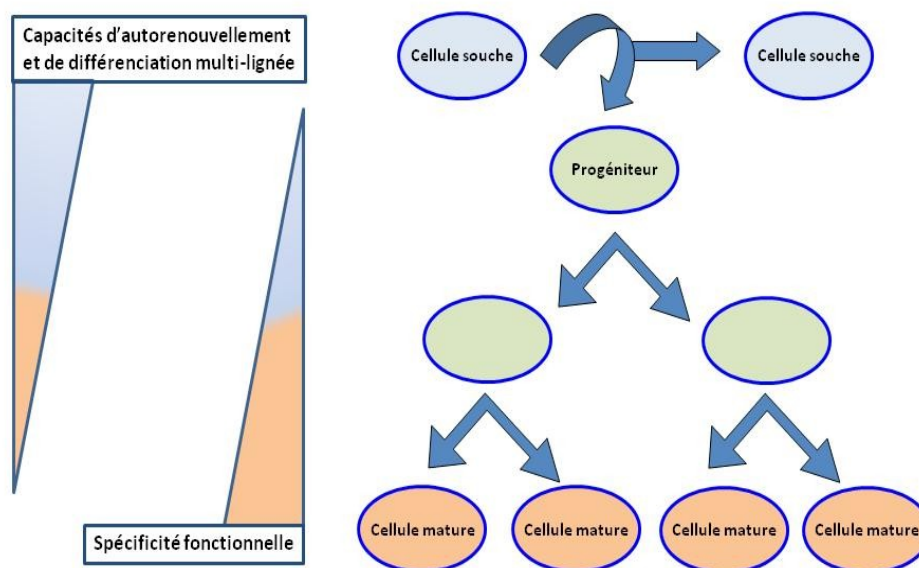
Cette notion de thérapie cellulaire repose donc sur la notion de cellule souche. Les cellules souches ont par définition des capacités **d'auto-renouvellement** et de **différenciation**

multi- lignée. La biologie cellulaire des cellules souches est un domaine encore en pleine expansion et comportant de nombreuses inconnues. On considère que par un phénomène de division cellulaire asymétrique, une cellule souche mère conduira à la formation d'une cellule souche fille permettant le maintien d'un stock de cellules souches, et donc de la capacité d'auto- renouvellement ; et en même temps de la formation d'une cellule fille qui s'engagera dans la différenciation cellulaire, appelée cellule progénitrice. Cette cellule progénitrice va progressivement acquérir des spécificités fonctionnelles au cours du phénomène de différenciation cellulaire, mais perdre les capacités d'auto-renouvellement.

De manière très schématique, le concept de thérapie cellulaire vise à remplacer des cellules défectueuses dans un tissu donné grâce à l'apport de cellules souches. Les capacités de différenciation multi-lignée des cellules souches permettraient la formation de cellules fonctionnelles dans ce tissu, et la capacité d'auto-renouvellement assurerait le maintien d'un stock de cellules et ainsi une régénération maintenue à moyen voire à long terme. Grâce au fort potentiel régénératif des cellules souches, cette approche est donc très prometteuse à des fins thérapeutiques, mais comporte pour la même raison un risque de dégénérescence cellulaire et de croissance cellulaire incontrôlée, voire tumorale, qui doit absolument être maîtrisé et surveillé pour toute application clinique.

Les sources cellulaires éventuelles pour la thérapie cellulaire sont **les cellules souches embryonnaires**, les **cellules souches adultes** et depuis plus récemment **les cellules souches pluripotentes induites** (Induced Pluripotent Stem Cells, ou **IPS**, en anglais).

Figure 2 : Thérapie cellulaire



II.1 CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Les cellules souches embryonnaires, qui peuvent être obtenues à des stades très précoces de la différenciation embryonnaire (notamment à partir d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro*), possèdent la caractéristique de *totipotence*. Il s'agit du pouvoir de différenciation vers toutes les lignées cellulaires. Théoriquement, dans des conditions de culture cellulaire adéquate *in vitro*, les cellules souches embryonnaires peuvent être différenciées en tout type de cellules matures. Dans une démarche de thérapie cellulaire, il serait donc possible soit d'implanter des cellules souches directement, soit des cellules matures obtenues *in vitro* par différenciation ciblée de cellules souches embryonnaires.

Les cellules embryonnaires ont donc des intérêts thérapeutiques éventuels très nombreux. Mais de nombreuses questions, notamment d'ordre éthique, sont soulevées et l'utilisation des cellules souches embryonnaires est très encadrée sur le plan législatif. En France, la nouvelle loi relative à la bioéthique (7 juillet 2011) a maintenu la possibilité pour les équipes de recherche françaises de réaliser, dans le cadre de protocoles autorisés et par dérogation, des recherches sur les cellules souches embryonnaires, notamment lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition qu'il soit expressément établi qu'il est impossible de parvenir au résultat escompté par le biais d'une recherche ne recourant pas à des embryons humains, des cellules souches embryonnaires ou des lignées de cellules souches.

II.2 CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, OU IPS)

Une alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires est représentée par la possibilité de créer des cellules IPS. Les travaux pionniers de Takahashi et collaborateurs (2007) ont montré qu'il était possible de reprogrammer des cellules matures grâce à l'expression de différents facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Kif4, c-MYC). Ce procédé permet d'obtenir des cellules « embryonnaires-like », ayant des caractéristiques très proches (mais pas identiques...) aux véritables cellules souches embryonnaires.

Les cellules IPS saines constituent donc une source potentielle de thérapie cellulaire. En dehors du domaine de la thérapie cellulaire, cette approche permet la création de lignées de cellules malades, porteuses d'un défaut génétique donné, et pouvant être utilisées pour un criblage moléculaire pharmacologique. Cette technologie innovante présente de très nombreuses perspectives mais est confrontée encore à ce jour à de nombreux obstacles pratiques (faible efficacité de la reprogrammation cellulaire; oncogénicité potentielle; etc.).

II.3 CELLULES SOUCHES ADULTES

L'alternative majeure à l'utilisation de cellules souches embryonnaires réside en l'utilisation de cellules souches adultes. De nombreux travaux ont établi clairement que des cellules

souches ou cellules progénitrices très immatures existent dans tous les tissus d'un organisme adulte (cellules souches hématopoïétiques, neuronales, musculaires, épidermiques, pancréatiques, hépatiques, etc.).

Les cellules souches adultes possèdent la caractéristique de *multipotence*, c'est-à-dire le pouvoir de différenciation des progéniteurs vers plusieurs lignées cellulaires du tissu considéré. Dans certaines conditions spécifiques les cellules souches adultes peuvent également subir un phénomène de *transdifférenciation*, c'est-à-dire la différenciation d'une lignée cellulaire vers une autre lignée cellulaire. Contrairement aux autres cellules souches embryonnaires, les questions éthiques sont ici similaires aux problèmes soulevés par les greffes d'organes.

III LA THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique est définie comme la modification du matériel génétique de cellules vivantes par transfert d'acide nucléique, et ceci à des fins thérapeutiques.

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. French 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. Alain 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), mais ceci ne sera pas abordé dans ce chapitre. A ce jour, plus de 1700 essais cliniques ont été répertoriés dans la « *Journal of Gene Medicine 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.

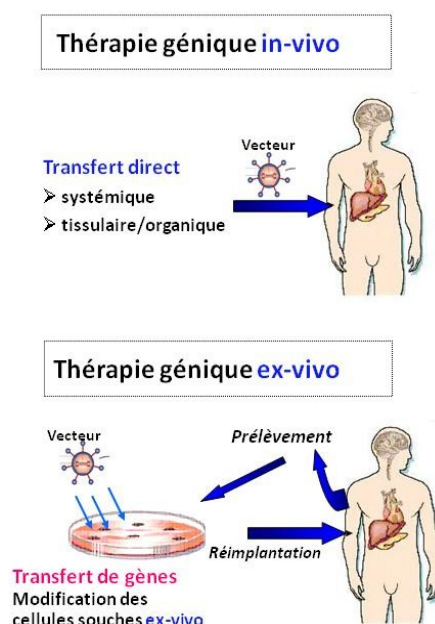
La thérapie génique germinale n'est donc pas envisageable chez l'homme. Par contre, la thérapie génique sur des cellules somatiques a pu être envisagée selon différentes modalités : la thérapie génique *in vivo* et la thérapie génique *ex vivo*.

III.1 THÉRAPIE GÉNIQUE IN VIVO

Tout d'abord, 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.

Figure 3 : Thérapie génique *in vivo* et *ex-vivo*



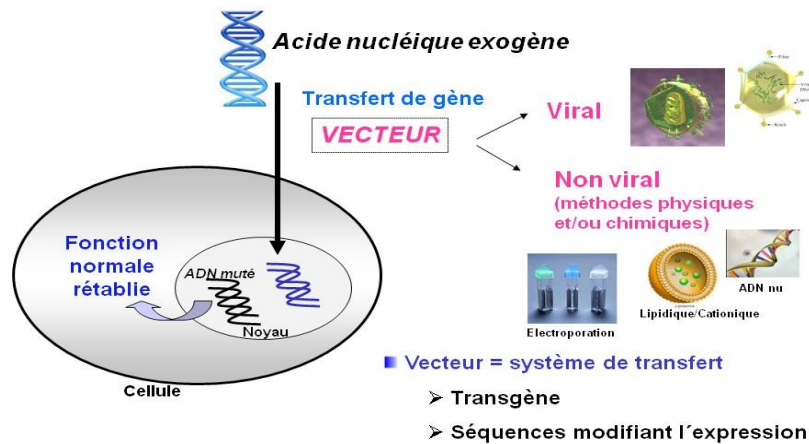
III.2 THÉRAPIE GÉNIQUE EX VIVO

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 donc 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.

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. On distingue les vecteurs de type viral et les systèmes de transfert non-viraux (ou vecteurs non-viraux).

Figure 4 : Thérapie génique ex vivo



III.2.1 Vecteurs viraux

Les différents types de vecteurs viraux ont été développés à partir de virus sauvages rendus non répliatifs 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.A.Vs »).

III.2.2 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.

III.2.3 Utilisation d'un transgène

La première stratégie principale pour la thérapie génique est d'utiliser un transgène, c'est-à-dire une séquence codant un ARNm messager 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.

Néanmoins, les éléments régulateurs, en particulier le promoteur du gène, peuvent être choisis de manière à permettre dans la mesure du possible un niveau le plus approprié et spécifique du tissu cible. La spécificité tissulaire du promoteur est particulièrement importante, car une expression ectopique du produit du transgène dans des cellules du

système immunitaire capables de présenter les antigènes, ou dans d'autres cellules non cibles, peut s'avérer délétère.

III.2.4 Modulation de l'expression

Une deuxième stratégie de transfert de gènes est la modulation de l'expression, approche très développée au cours de ces dernières années. L'objectif est ici d'apporter à la cellule des acides nucléiques qui vont interférer avec certains ARNm exprimés dans la cellule cible, porteuse du déficit génétique à corriger. Cette modulation de l'expression peut être quantitative ou qualitative.

La modulation de l'expression quantitative peut avoir pour objectif de dégrader de manière ciblée certains ARNm, notamment par le phénomène appelé « ARN interference » (par exemple pour dégrader l'ARNm d'une protéine mutée toxique pour la cellule), ou au contraire de stabiliser dans la cellule certains ARNm (par exemple des ARNm rendus instables par une mutation).

La modulation de l'expression peut également être qualitative. Le terme de « chirurgie du gène » est souvent utilisé pour cette stratégie, qui consiste en l'élimination ciblée de mutations au niveau de la cellule. Si une cellule est porteuse de mutations, responsables d'un défaut cellulaire, on peut imaginer que d'enlever ces mutations permettra de conduire au rétablissement d'un bon fonctionnement cellulaire. Il reste encore à ce jour très difficile d'éliminer des mutations directement au niveau génomique (différentes approches notamment de correction par recombinaison homologue ciblée existent, mais sont encore trop peu efficaces). Par contre, des techniques beaucoup plus efficaces ont été mises au point au cours de ces dix dernières années pour éliminer des mutations de manière ciblée au niveau de l'ARNm produit à partir d'un gène muté. Les mutations persistent alors au niveau du gène (au niveau génomique), mais l'élimination des mutations au niveau de l'ARNm permettra de synthétiser une protéine fonctionnelle. Ces approches ont par ailleurs l'avantage d'agir directement sur un ARNm exprimé par la cellule, donc un ARN messager endogène soumis à une régulation précise : théoriquement, les niveaux d'expression protéique après correction de l'anomalie génétiques seront donc proches des niveaux endogènes. Les principales techniques de « chirurgie du gène » sont actuellement le « saut-d'exon » (« exon-skipping ») et le « trans-épissage » (« trans-splicing »).

Principe de la modulation de l'expression par les stratégies du "saut-d'exon" et du "trans-épissage".

Lorsqu'une cellule est porteuse d'une mutation dans un gène, cette mutation va se retrouver après transcription au niveau de l'ARNm. Le phénomène de transcription permet d'obtenir en différentes étapes un ARNm qui sera ensuite traduit en

protéine. La première étape de la transcription permet la synthèse d'un pré-ARNmessenger qui comporte à la fois des exons avec l'information génétique codante et des introns qui seront éliminés au cours du phénomène d'épissage.

- **Le principe du « saut d'exon »**

Il consiste à intervenir sur le phénomène d'épissage pour induire une délétion ciblée d'un exon porteur d'une mutation (cette approche peut également concerner plusieurs exons en fonction du type de mutation), et permettant de maintenir un cadre de lecture ouvert. Suite au saut d'exon, l'ARNmessenger mature permettra la synthèse d'une protéine pour laquelle une partie aura été délétée : un prérequis essentiel à ce type d'approche est donc que cette protéine résultante, bien que partiellement tronquée, maintienne une fonctionnalité suffisante. L'intervention sur l'épissage est possible en bloquant des sites essentiels dans ce phénomène (sites d'épissage et de régulation de l'épissage), en utilisant des séquences « antisens » qui vont masquer ces sites. Les séquences antisens peuvent être introduites dans les cellules cibles par un vecteur (viral ou non viral). Il peut s'agir notamment d'oligonucléotides qui peuvent être administrés sous différentes formes biochimiques, avec un effet direct au niveau génétique : donc une approche de thérapie génique, mais basée sur une approche pharmacologique. Plusieurs essais thérapeutiques prometteurs basés sur le « saut d'exon » sont actuellement en cours.

- **Le principe du « trans-épissage »**

Il consiste à remplacer une séquence mutée par une séquence normale : en agissant sur le phénomène d'épissage, il est ainsi possible de remplacer une partie d'un pré-ARNmessenger porteur d'une mutation, par une séquence normale apportée par le transfert de gènes. Ce remplacement de la séquence mutée par une séquence normale au niveau du pré-ARN messenger permet donc d'obtenir un ARNmessenger mature normal qui sera traduit en protéine. Cette protéine ne comportera plus la mutation et pourra donc être fonctionnelle au niveau de la cellule.

Figure 5 : Le principe du "saut d'exon"

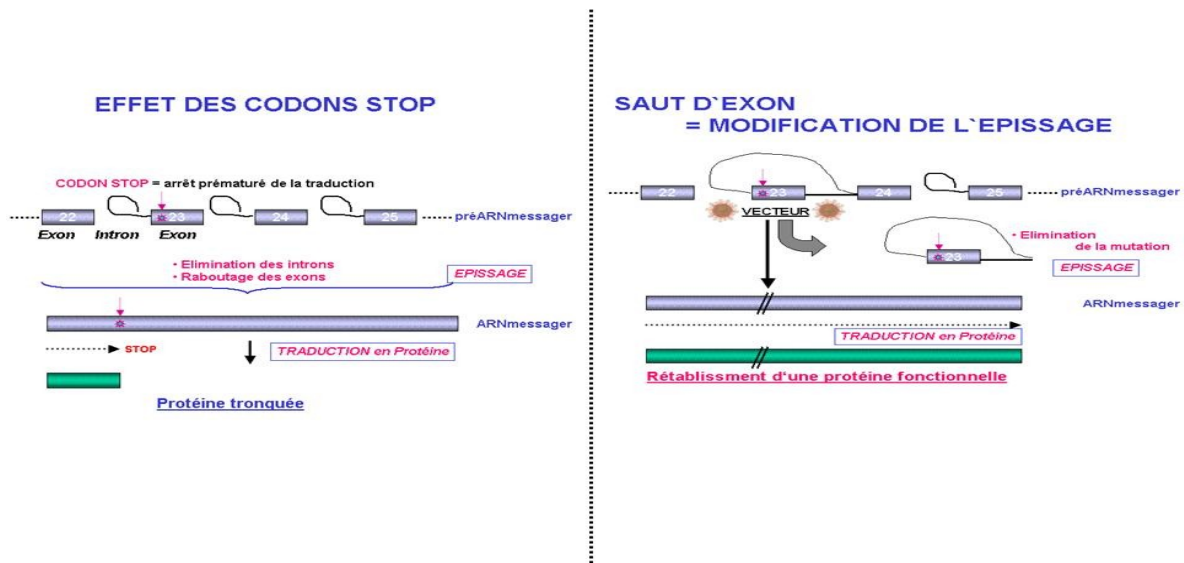
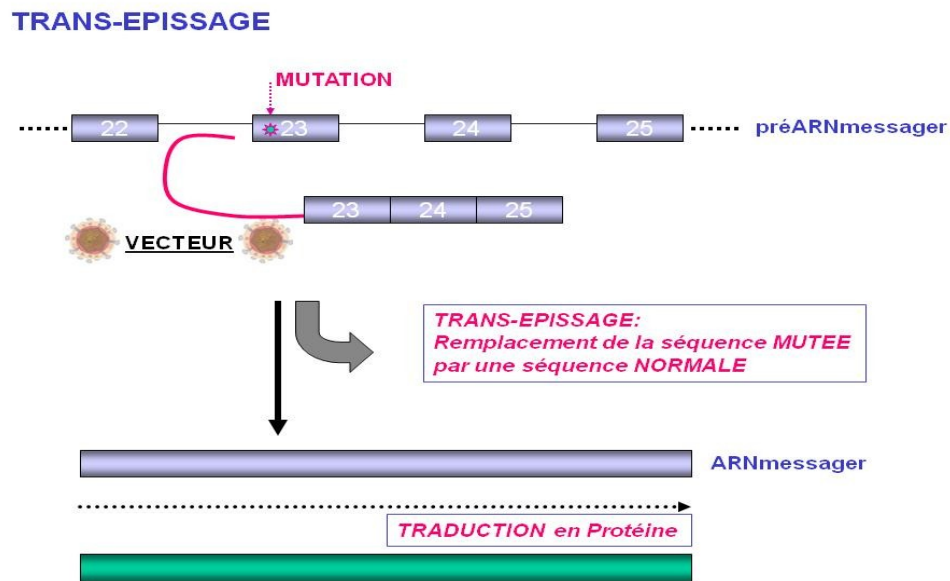


Figure 6 : Le principe du "trans-épissage"



CONCLUSION

Grâce aux progrès importants dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies monogéniques, des approches thérapeutiques ciblées sont actuellement en développement. Le contexte des maladies monogéniques se confronte à des obstacles particuliers, dont le nombre souvent réduit d'effectifs de patients pour les essais cliniques, et le faible intérêt que peut porter l'industrie pharmaceutique au développement de « médicaments » dont le marché éventuel est restreint. Pour favoriser le développement d'approches thérapeutiques prometteuses pour les maladies rares, le statut de

« médicament orphelin » a été créé au niveau européen, ce qui permet de solliciter des aides spécifiques (subventions, frais réduits d'enregistrement, avantages d'exploitation, etc.).

Les résultats prometteurs se multiplient aussi bien pour des approches pharmacologiques, que pour des approches de thérapie cellulaire et/ou génique, et qu'il s'agisse de preuves de principe sur des modèles cellulaires ou animaux, ou d'essais cliniques. Mais suite à des premiers succès pour une maladie donnée, la persévérance des chercheurs reste essentielle pour le chemin qui reste à parcourir jusqu'à une éventuelle autorisation de mise sur le marché.

(Quelques exemples marquants de progrès dans les approches thérapeutiques des maladies monogéniques : http://umof.univ-nantes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique15/site/html/genetique15_tableau.pdf)

Liens utiles :

www.orpha.net

www.afssaps.fr

www.clinicaltrials.gov

www.afm-france.org

www.abedia.com/wiley