



THÉRAPIE GÉNIQUE

Patrick Midoux

Directeur de recherche

Centre de Biophysique Moléculaire

CNRS UPR4301, Orléans

THÉRAPIE GÉNIQUE

ESPOIR

THÉRAPIE GÉNIQUE

ESPOIR

AVENTURE

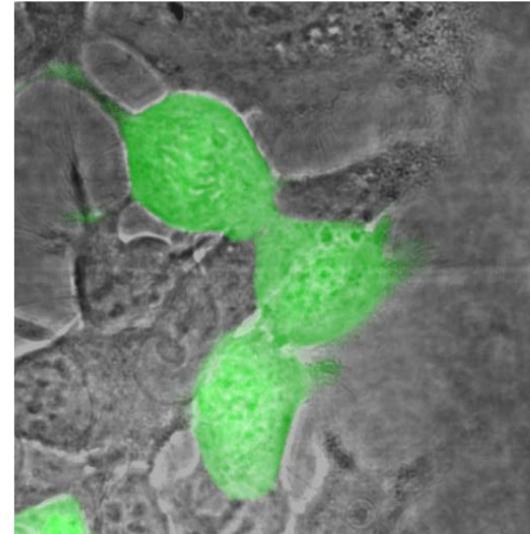
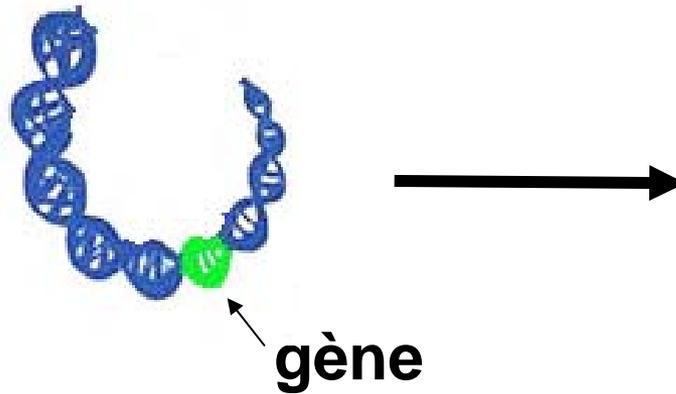
Définitions

Les Vecteurs

Les succès de la Thérapie génique

Stratégies innovantes

La thérapie génique consiste à intégrer dans les cellules un gène-médicament afin qu'elles fabriquent une protéine susceptible de résoudre l'anomalie responsable de la maladie.



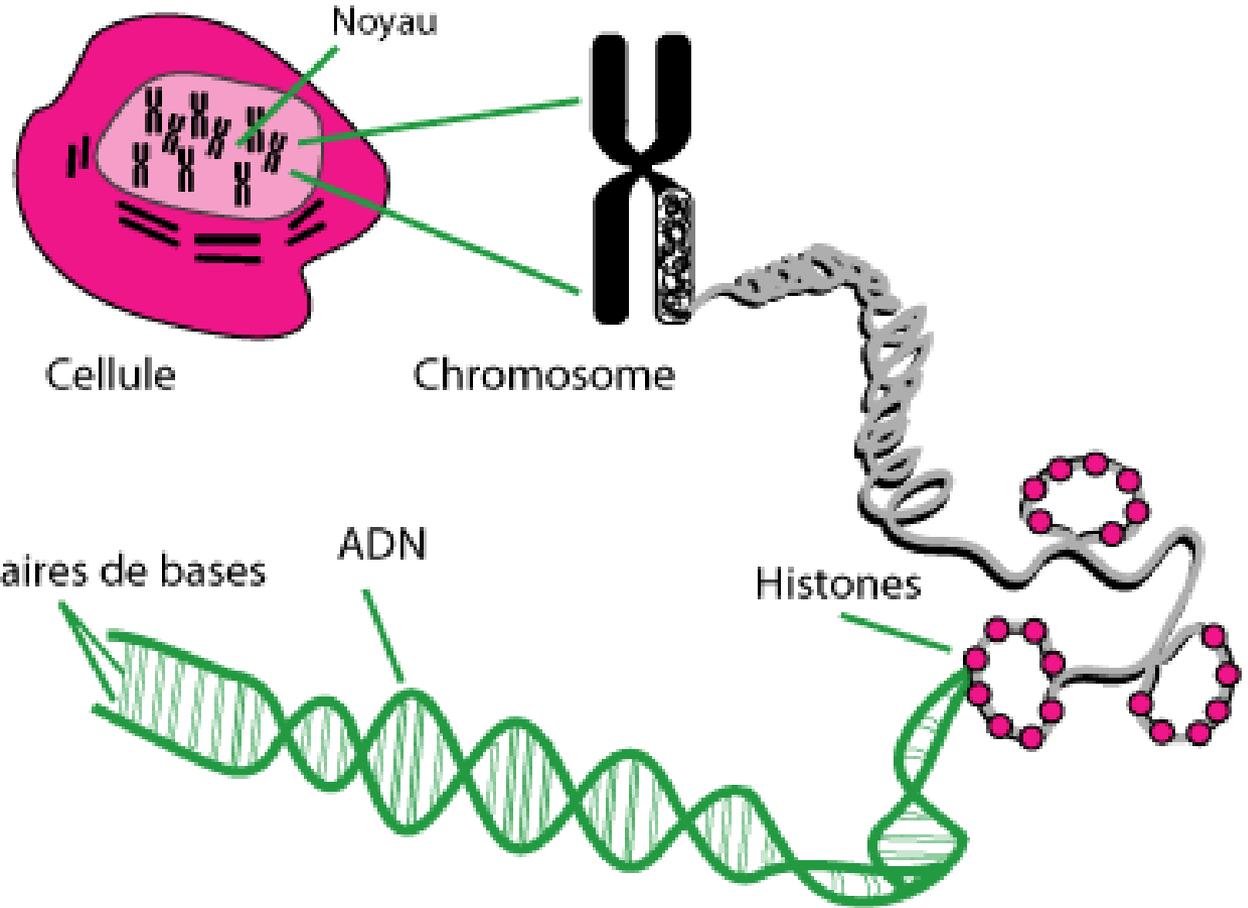
Autorisée

Thérapie génique somatique (dans cellules non germinales).

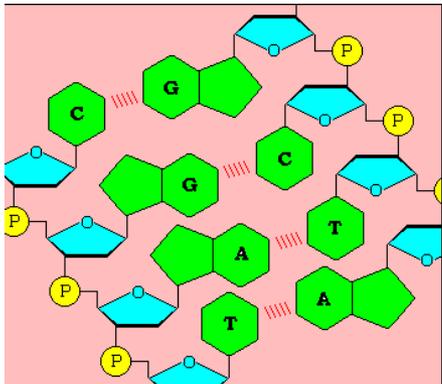
Non autorisée

Thérapie génique germinale. Cette méthode pose des problèmes éthiques, notamment parce qu'elle touche au patrimoine héréditaire de l'homme.

Le gène est une portion d'acide désoxyribonucléique (ADN), le support de notre information génétique. Les gènes contrôlent la fabrication des protéines Indispensables à la survie de la cellule.



Code génétique ATCG



Nombre de gènes codant une protéine environ 30 000.

Une cellule humaine est capable de traduire en protéine n'importe quel gène, y compris si celui-ci ne fait pas partie du stock de gènes humains.



Introduire un gène sain dans le noyau de la cellule malade

- Connaître l'anomalie génétique à l'origine de la maladie,
- Connaître la fonction du gène que l'on insère et que cette fonction puisse résoudre le mécanisme pathologique à l'origine de la maladie.

1 gène défectueux → une maladie

Mucoviscidose

Maladie héréditaire la plus fréquente en Europe avec une fréquence à la naissance de 1/2500.

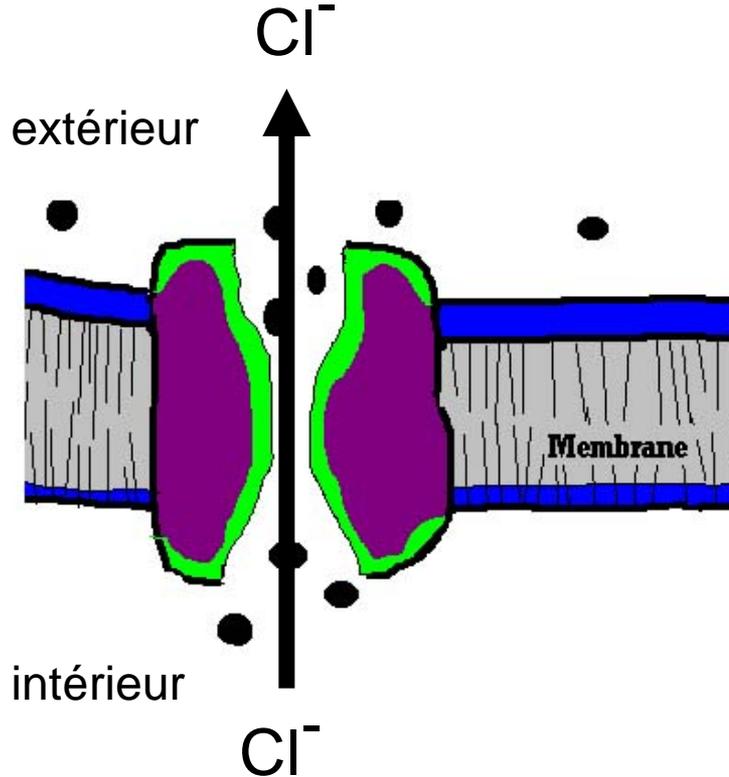
Les manifestations les plus graves : problèmes respiratoires et digestifs.

Responsable:

Mutation dans le **gène CF** code une **protéine CFTR** membranaire responsable du flux d'ions chlorure

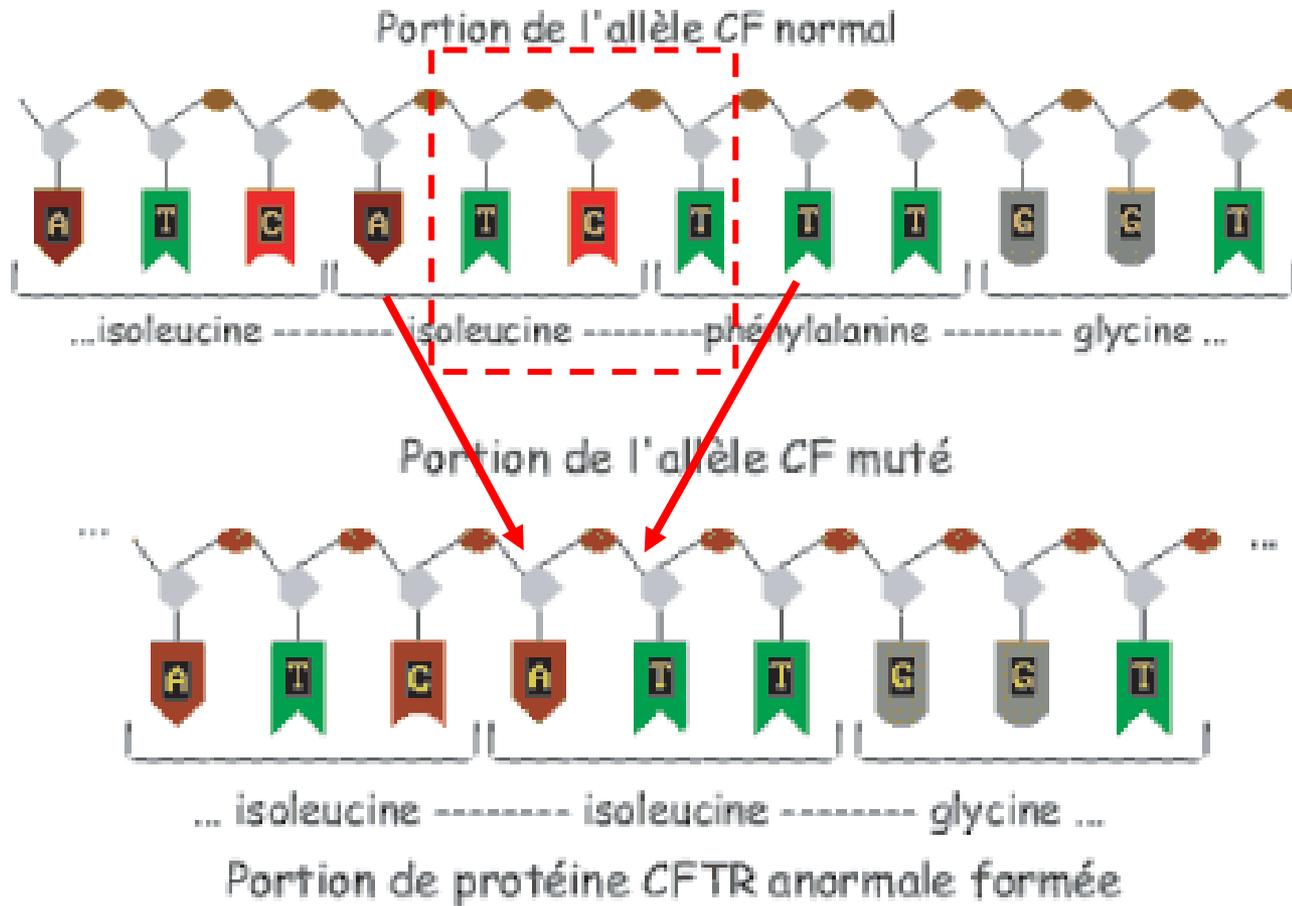
Conséquence:

Ces troubles ont pour origine la sécrétion d'un mucus trop épais, qui bouche progressivement les canaux présents dans les organes (bronches, canaux biliaires, canaux pancréatiques ...).



Mucoviscidose

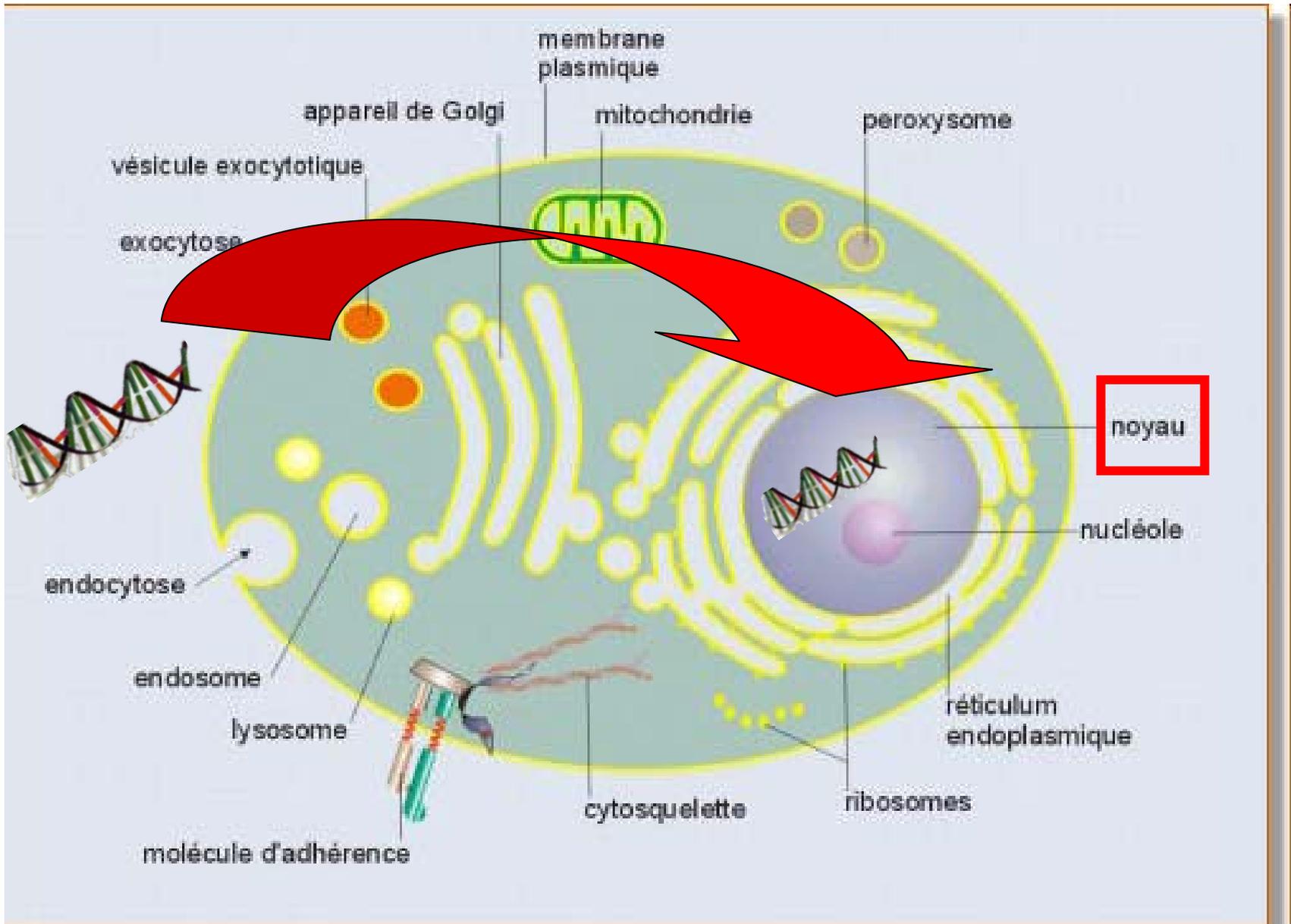
Mutation $\Delta F508$

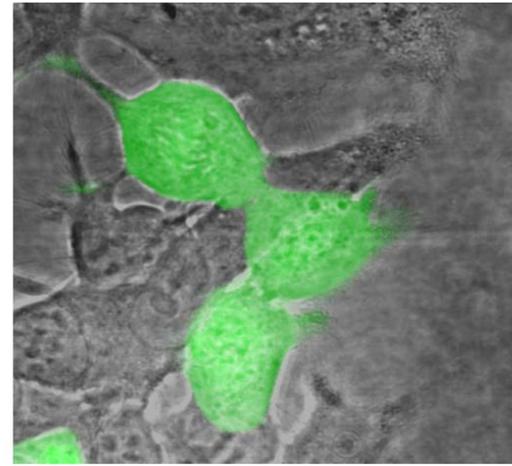
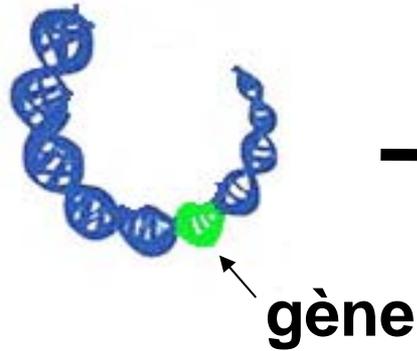


Transfert de gènes

Méthodes & Vecteurs

Transfert de gènes





Plasmide ou vecteur viral

Régions régulatrices (promoteur et enhancer)

- déterminent la spécificité de tissu
- déterminent le niveau d'expression
- permettent la régulation de l'ADNc

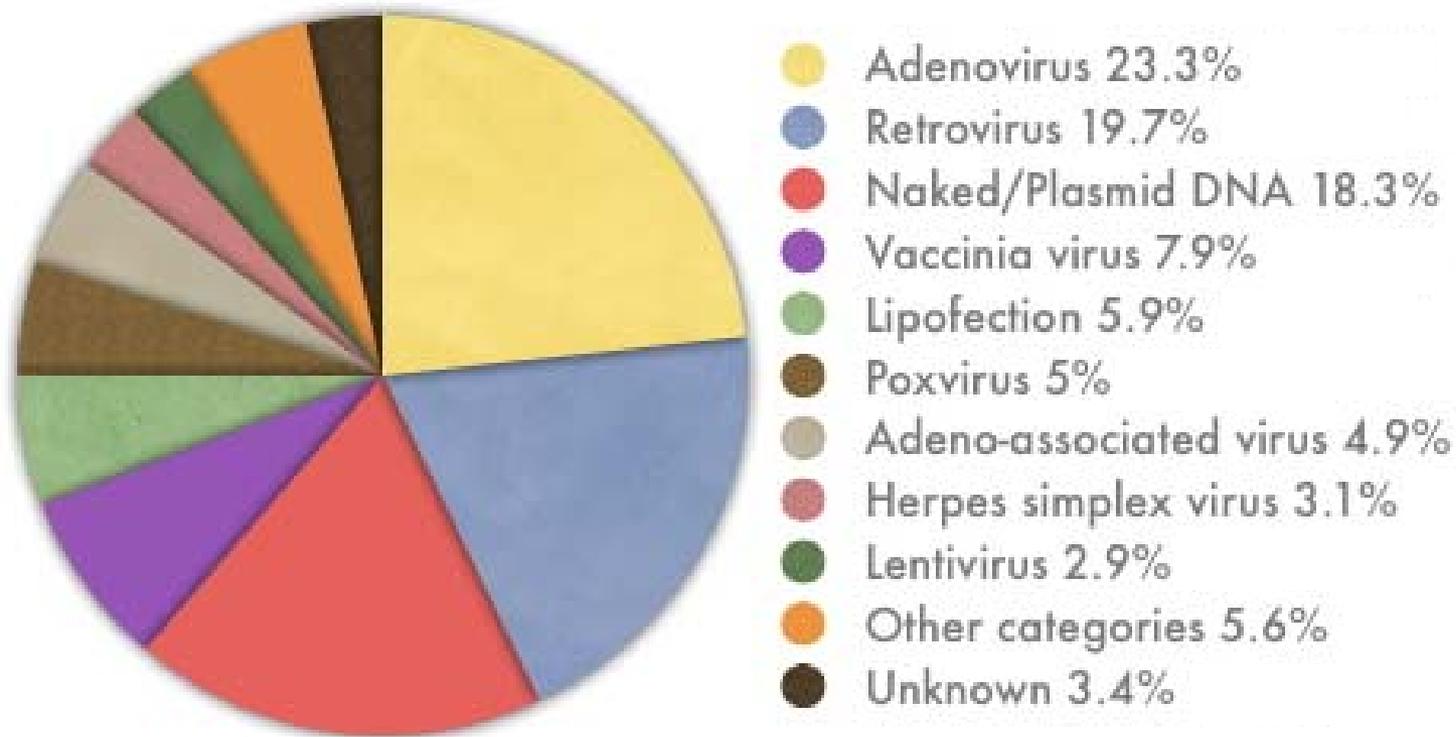
Vecteurs

Vecteurs non viraux

Vecteurs viraux

Essais cliniques

Les Vecteurs utilisés

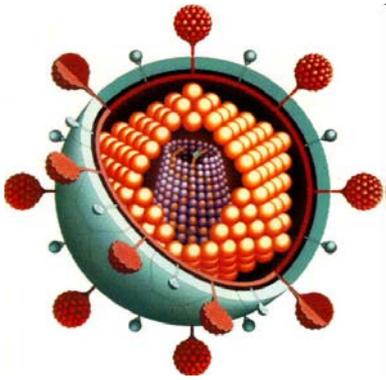


1850

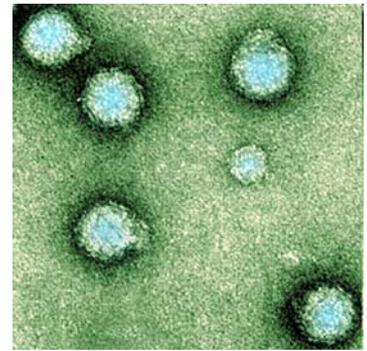
www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Vecteurs Viraux 67%

Les Vecteurs Viraux



Les Vecteurs Viraux



Grâce aux virus dont on connaît bien le génome, on dispose de vecteurs pour la thérapie génique

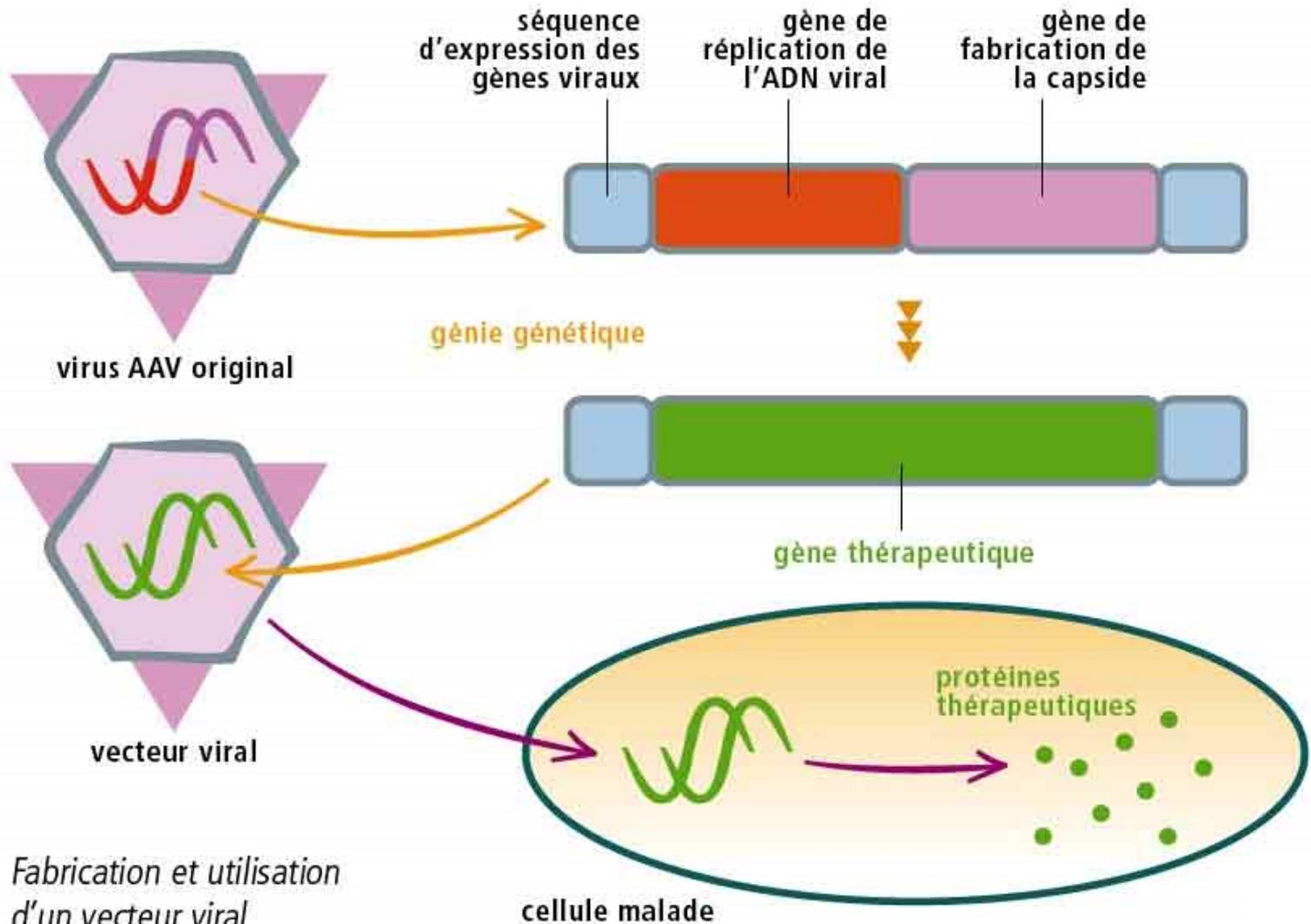
Vecteurs Rétroviraux, dérivés des rétrovirus de la leucémie murine (MLV, virus de Moloney)

Vecteurs Lentiviraux, dérivés du virus VIH

Vecteurs Adénoviraux, dérivés des virus responsables notamment de rhinopharyngites qui pénètrent efficacement dans les cellules pulmonaires

Adeno-associated virus (AAV), virus non pathogènes très répandus chez l'homme.

Les Vecteurs Viraux



Fabrication et utilisation d'un vecteur viral thérapeutique de type AAV.

Les Vecteurs Viraux

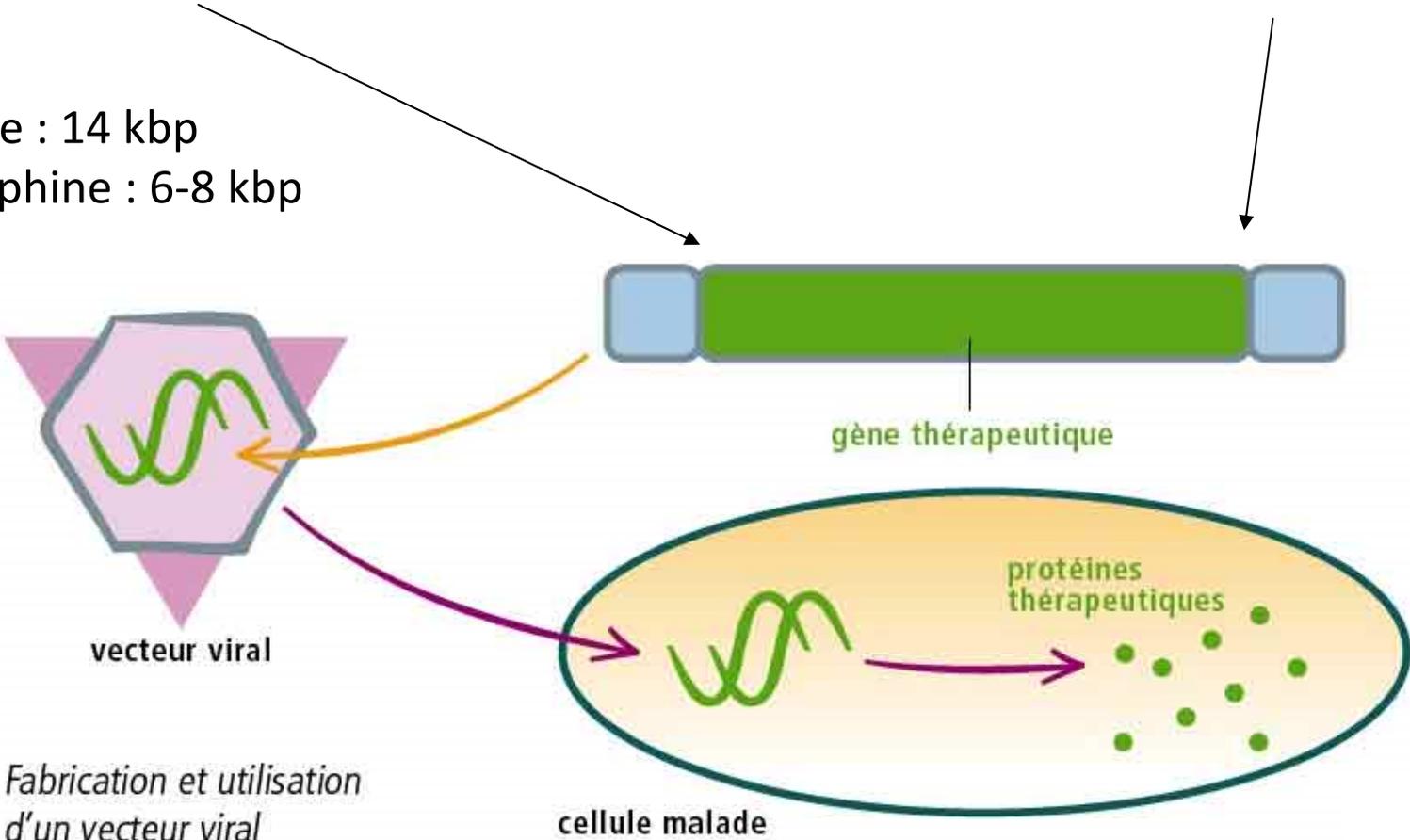
Rétrovirus
6-8 kbp

Lentivirus
8 kbp

Adénovirus
8 kbp

AAV
4,5 kbp

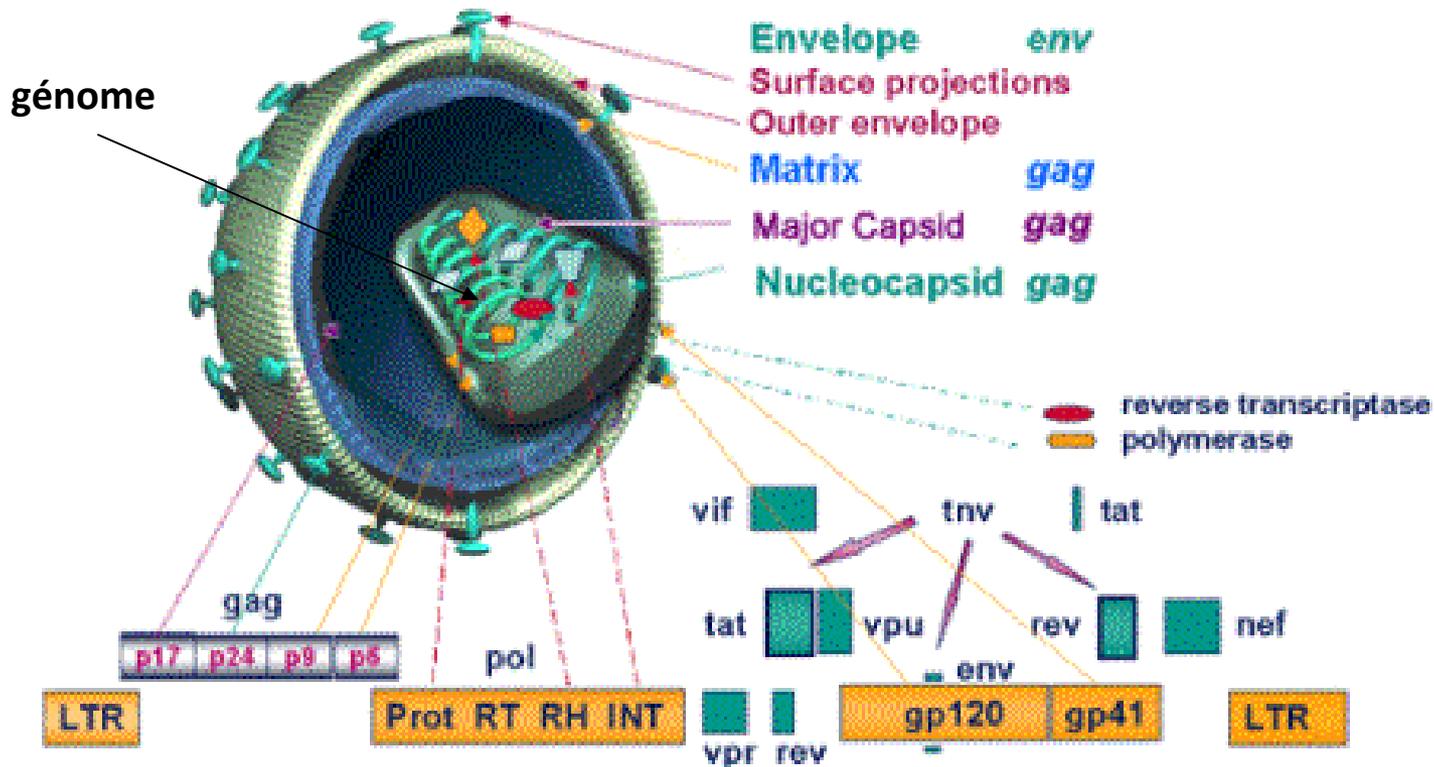
Dystrophine : 14 kbp
Minidystrophine : 6-8 kbp



Fabrication et utilisation d'un vecteur viral thérapeutique de type AAV.

Production des Vecteurs Viraux pour la thérapie génique

Lentivirus



Production des Vecteurs Viraux pour la thérapie génique

3 plasmides à transférer pour faire un lentivirus recombinant

1

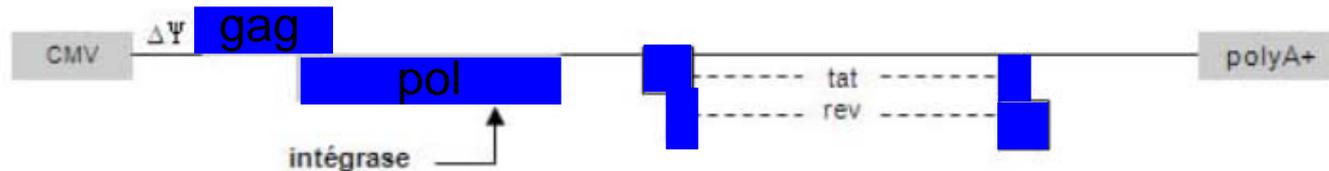
Plasmide vecteur (pTrip CMV GFP) contient le gène thérapeutique



Plasmide d'encapsidation (p8.91):

exprime les protéines nécessaires à la formation de la capsid (gag et pol), des éléments de régulation (tat, rev) et délété de la séquence ψ

2

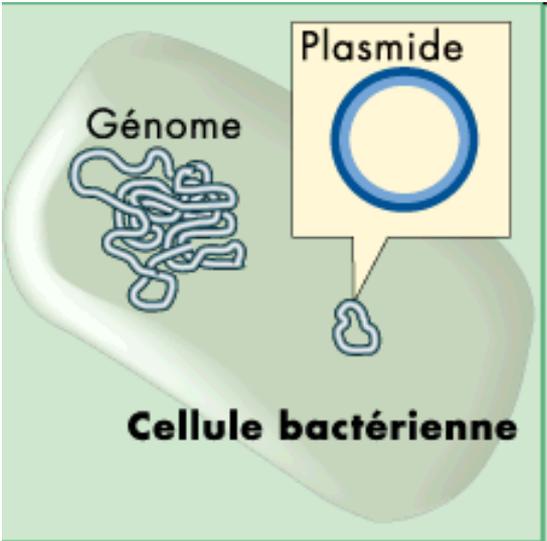


Plasmide d'enveloppe (pVSV-G):

exprime la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G)

3

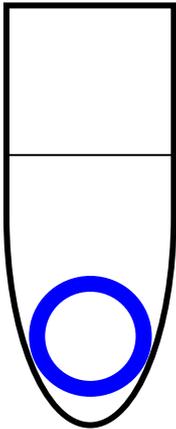




Culture bactérienne

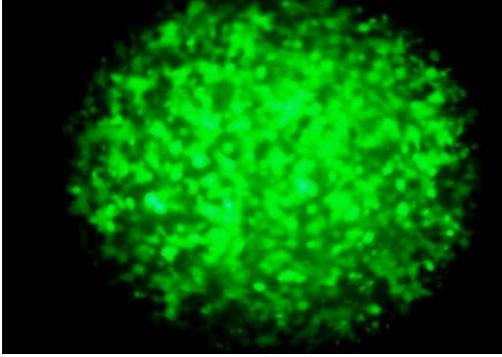
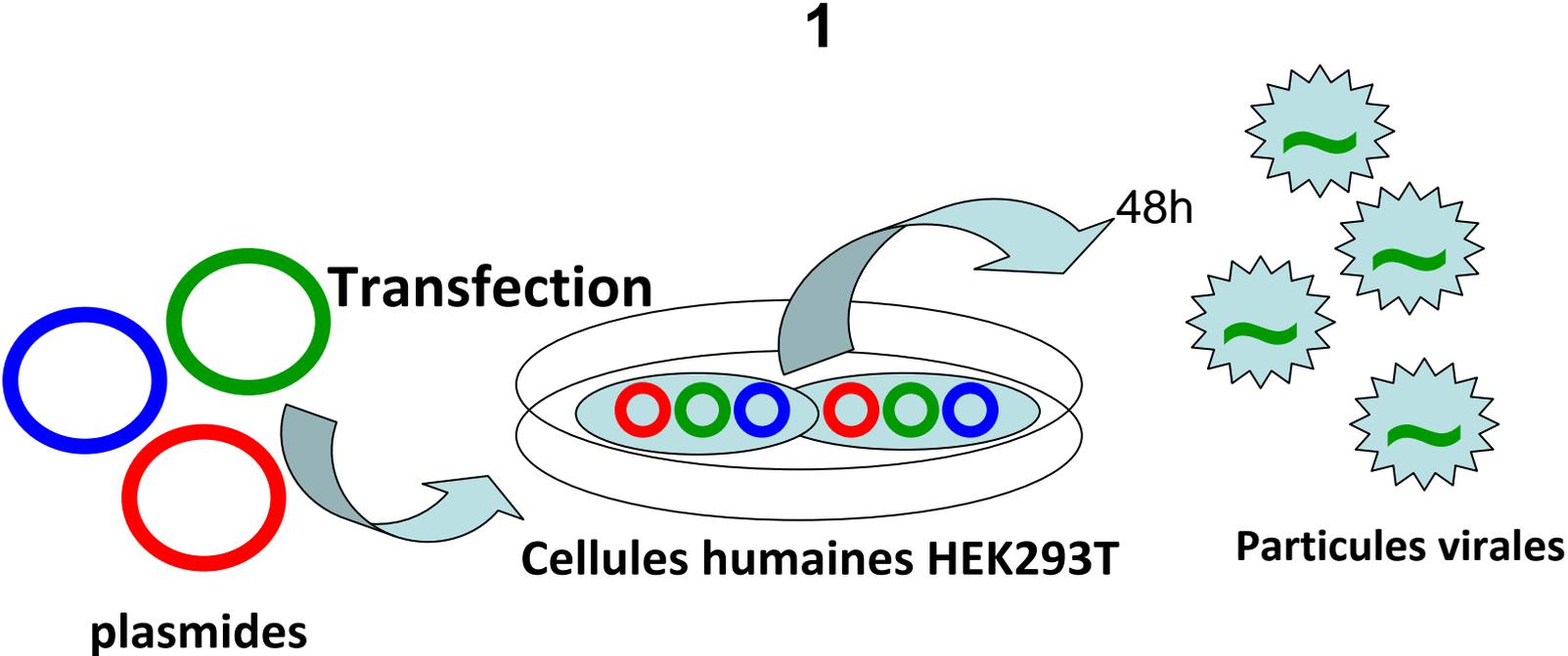


ensemencement



purification

Production des Vecteurs Viraux pour la thérapie génique



Production des Vecteurs Viraux pour la thérapie génique



2

**Production
à grande échelle**



bioreacteurs de 200 litres

3

Purification contrôle qualité des vecteurs



Production des Vecteurs Viraux pour la thérapie génique

Quelques chiffres

Thérapie génique Hémophilie B Facteur IX

Quantité injectée d'AAV par patient 2×10^{11} particules virales par kg
soit **$1,5 \times 10^{13}$** (**15 000 milliards**) par patient de 70 kg

Quantité d'AAV produite par cellules: **15 000** particules virales
par cellules

X 1 milliard

Si 100% R% 1 litre de culture

souvent seulement 1% : 100 litres de culture

Production des Vecteurs Viraux pour la thérapie génique

Production à grande échelle de vecteurs AAV- vecteurs
lentiviraux Institut des Biothérapies:
Généthon à Evry et Atlantic Gene Therapies à Nantes

Généthon Bioprod en chiffres

- **5 000 m²** dédiés à la bioproduction et au contrôle des produits de thérapie génique
 - Production de **20 lots cliniques par an** à pleine capacité
 - Jusqu'à **800 litres de culture en bioréacteurs** pour les produits de type AAV (4 bioréacteurs de 200 litres)
 - Jusqu'à **100 litres de culture** pour les vecteurs de type lentivirus

Les Vecteurs Viraux

Problèmes liés à leur utilisation

Insertion aléatoire du gène dans le génome

Risque d'activation de gènes endogènes: cancer

Stabilité moyenne (car extra-chromosomique): élimination

Risque de recombinaison avec un virus sauvage

Difficulté de régulation de l'expression du gène thérapeutique

Taille du gène thérapeutique

Immunogénicité potentielle

Toxicité

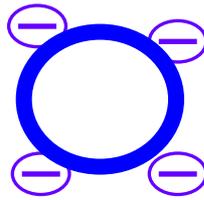
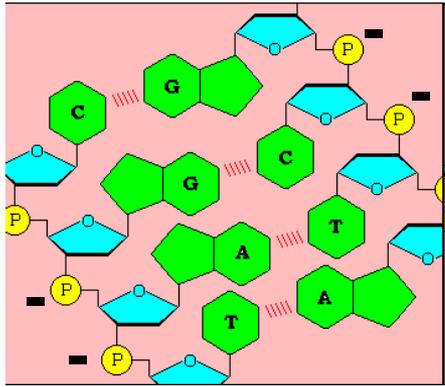
Production à grande échelle difficile et coûteuse

Les Vecteurs Synthétiques

Polymères cationiques

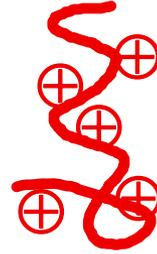
Liposomes cationiques

Polymères cationiques

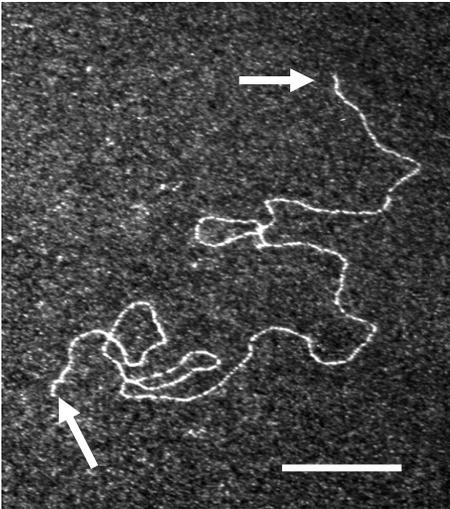
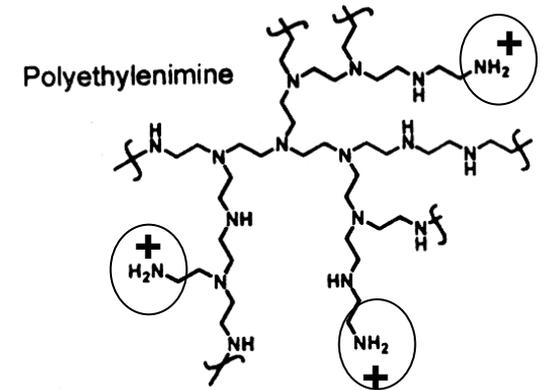


ADN

+

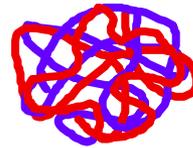


polymère

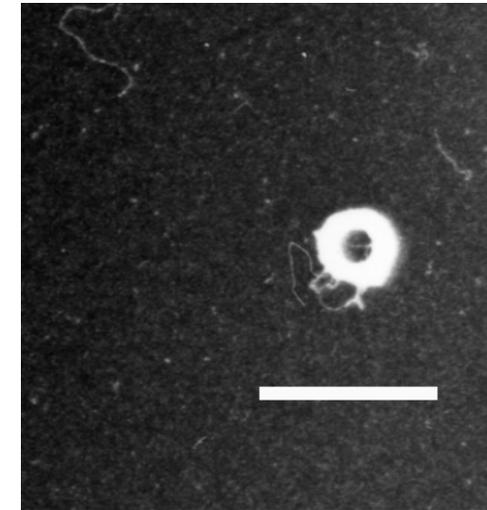


500 – 1000 nm

1 nm = 10^{-9} m

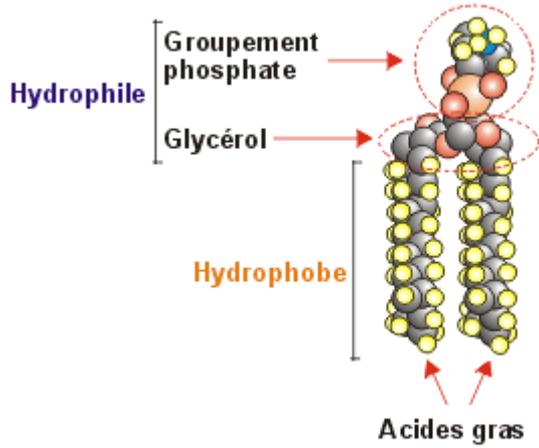


Complexe électrostatique

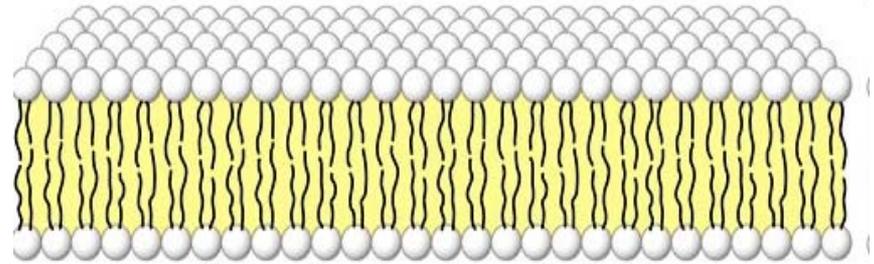


100 nm

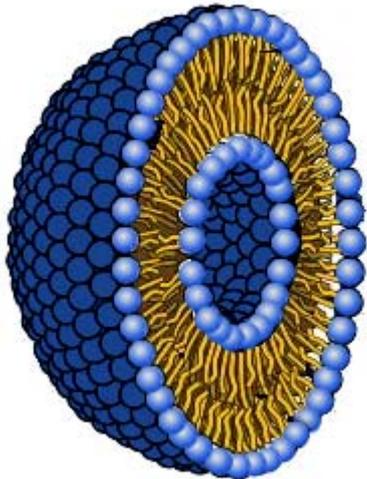
Liposomes



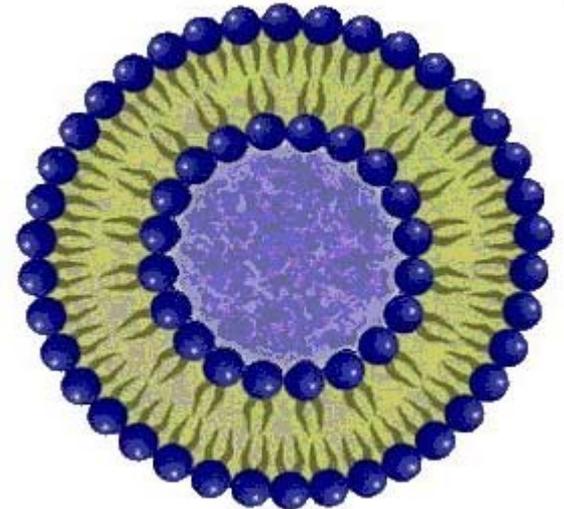
OU



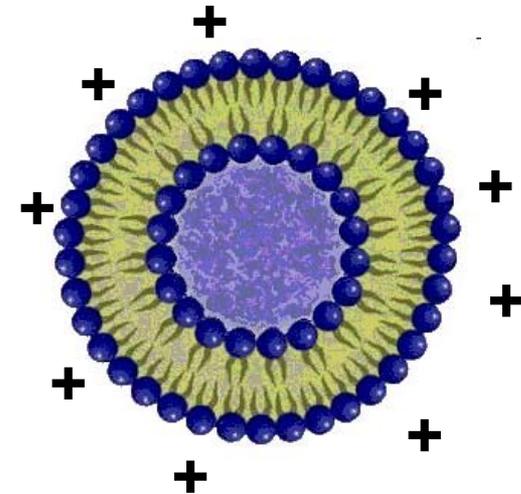
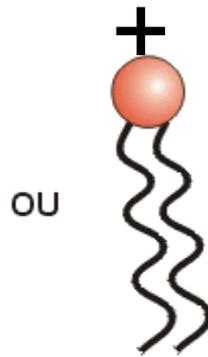
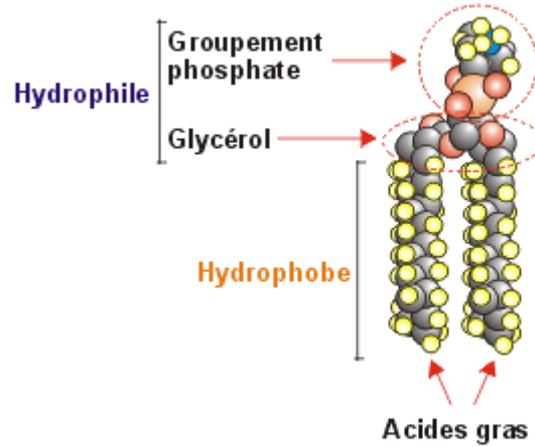
Bicouche de phospholipides



vésicules lipidiques



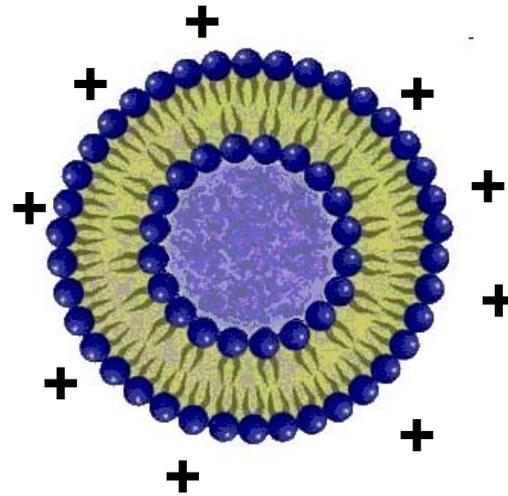
Liposomes cationiques



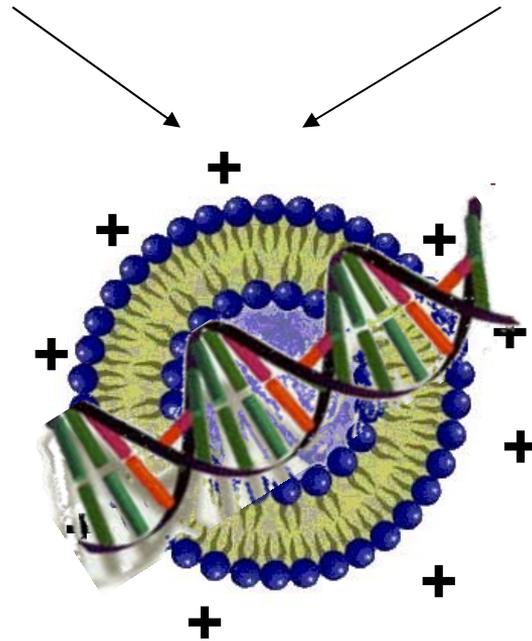
Liposomes cationiques



ADN



Liposome cationique

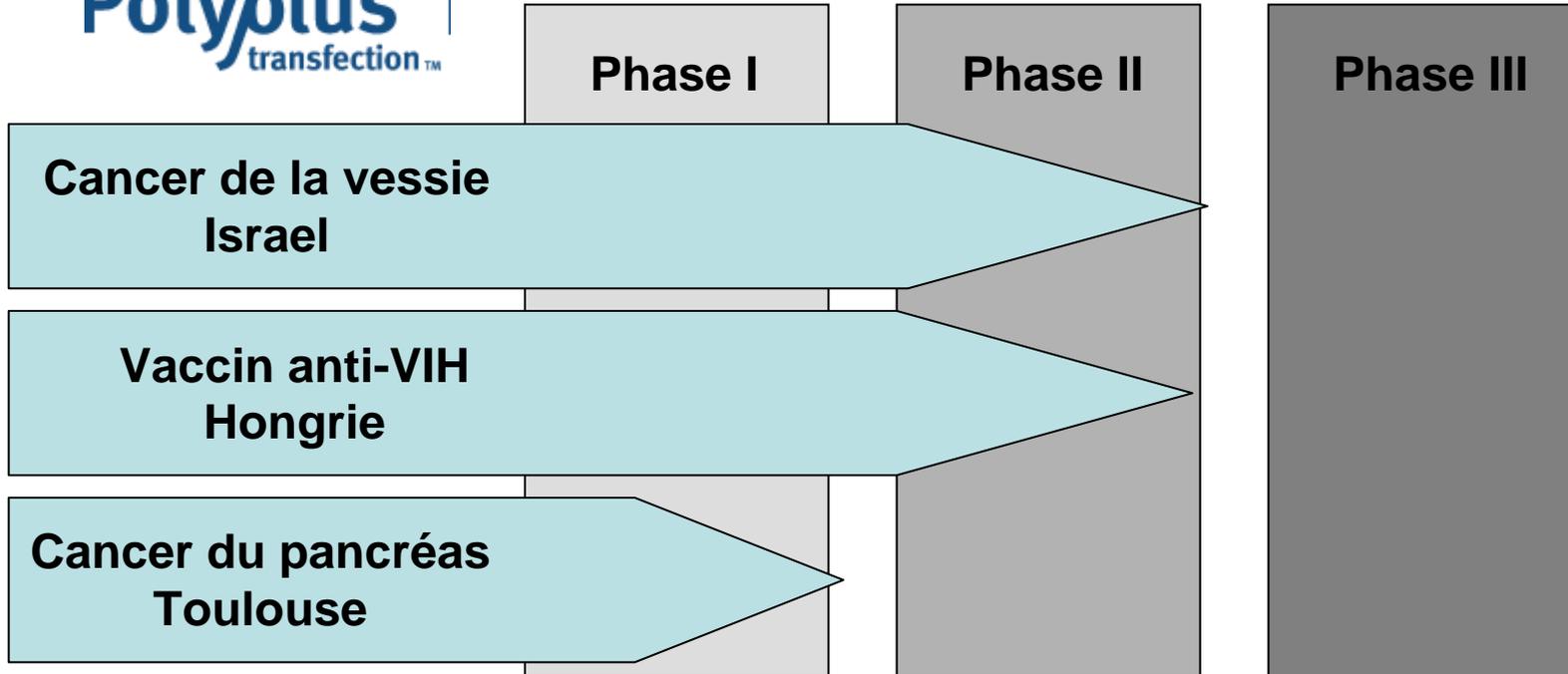


Complexes électrostatiques

Essais Cliniques avec Vecteurs Synthétiques

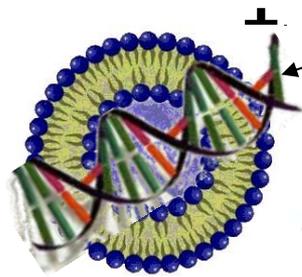


Polyplus⁺
transfection™



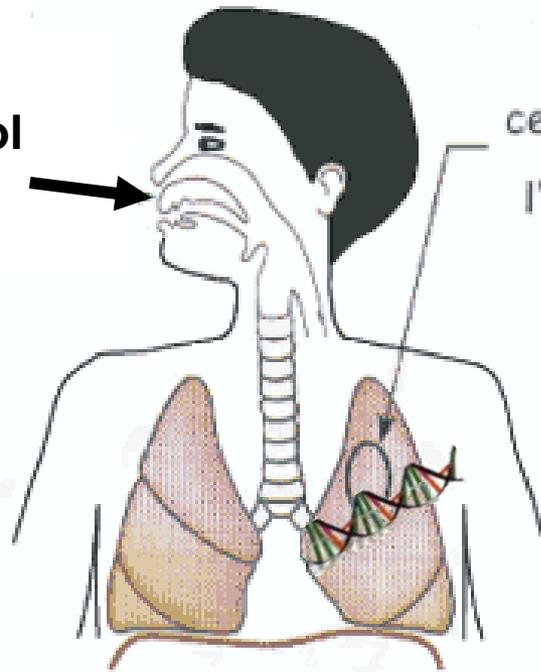
Essai Clinique avec Vecteurs Synthétiques Mucoviscidose

Liposomes



allèle normal du gène CF

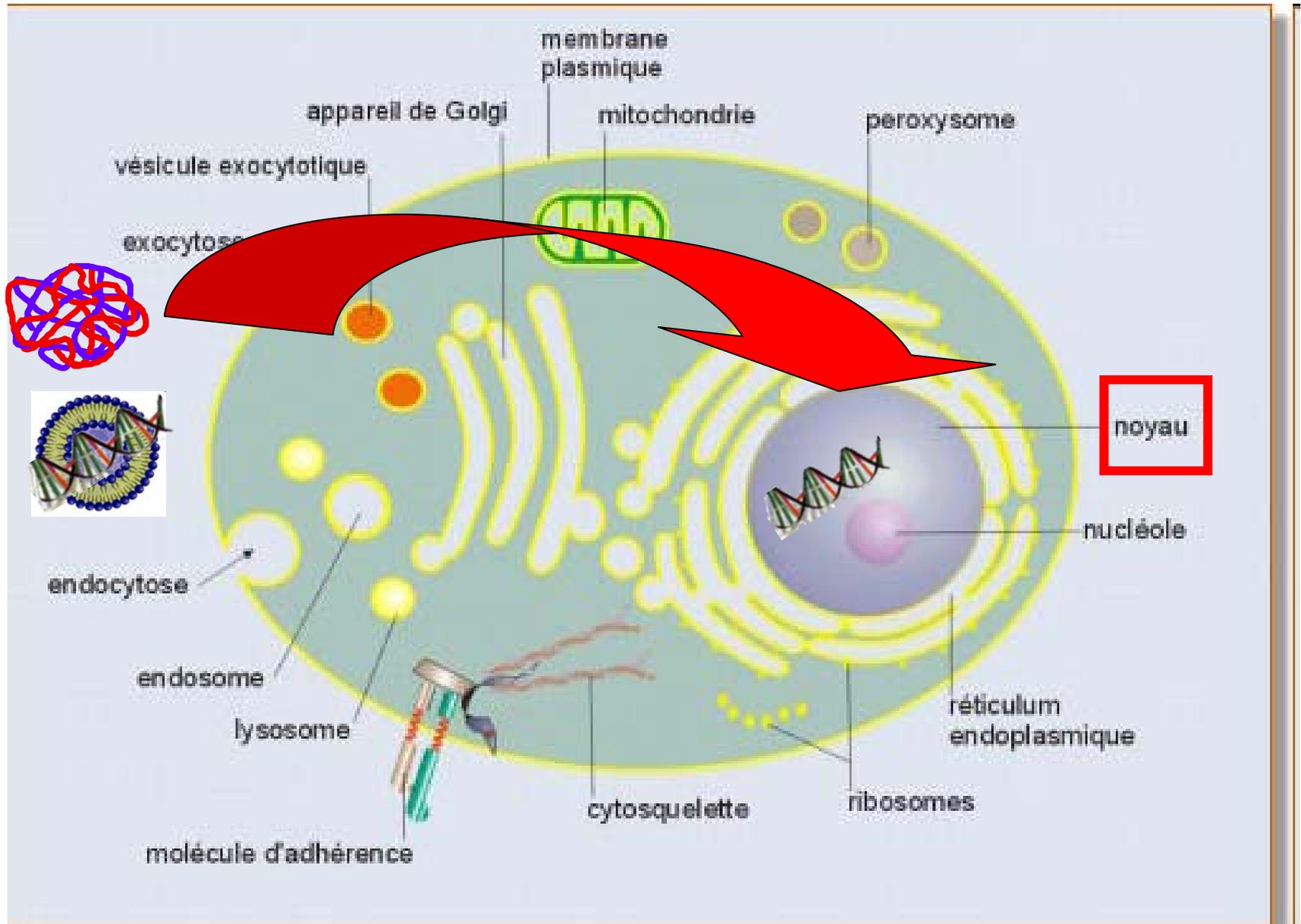
aérosol



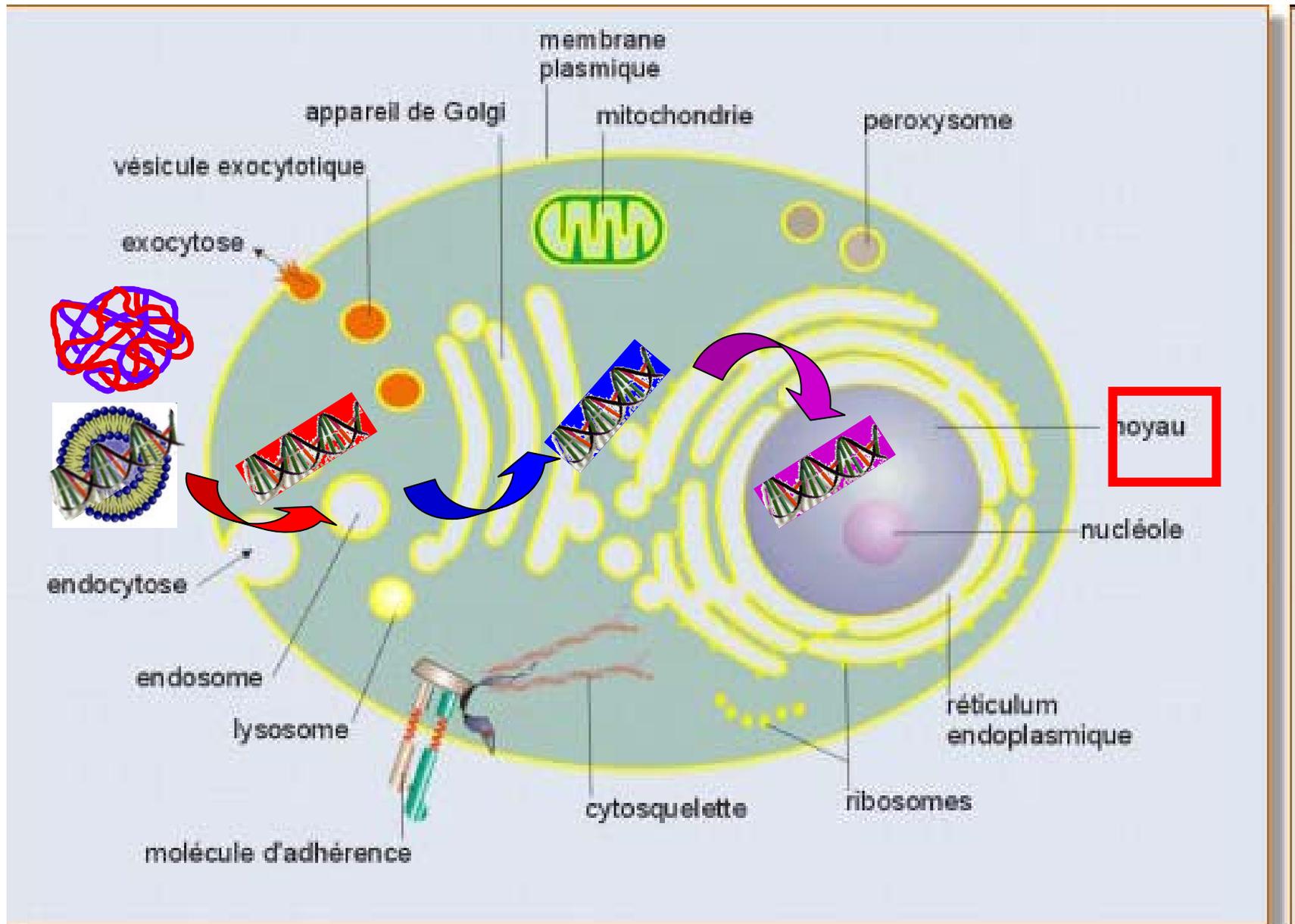
certaines cellules
intègrent
l'allèle normal

2013; En Angleterre; ~ 100 malades

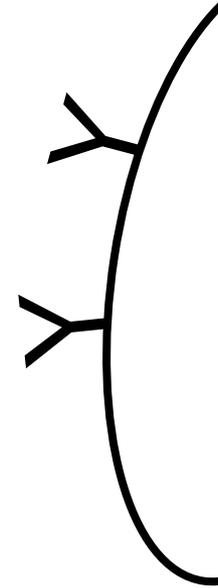
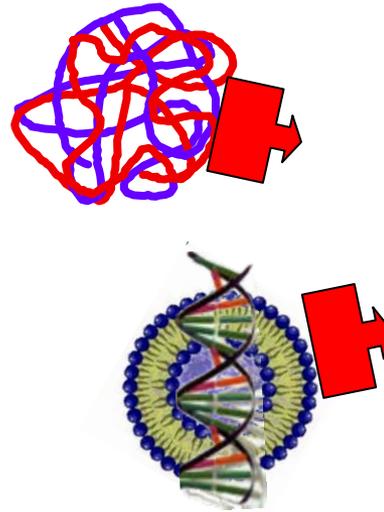
Recherches sur les Vecteurs: Objectif



Recherches sur les Vecteurs: Quel chemin?



Molécules de ciblage



Sucres

Galactose/lactose : Hepatocytes (foie)

Mannose : macrophages; cellules dendritiques (immunité)

Protéines

Transferrine : cellules tumorales

Vitamines

acide folique : cellules tumorales

Peptides

RGD peptides : vascularisation tumorale

Virus artificiel

Extérieur

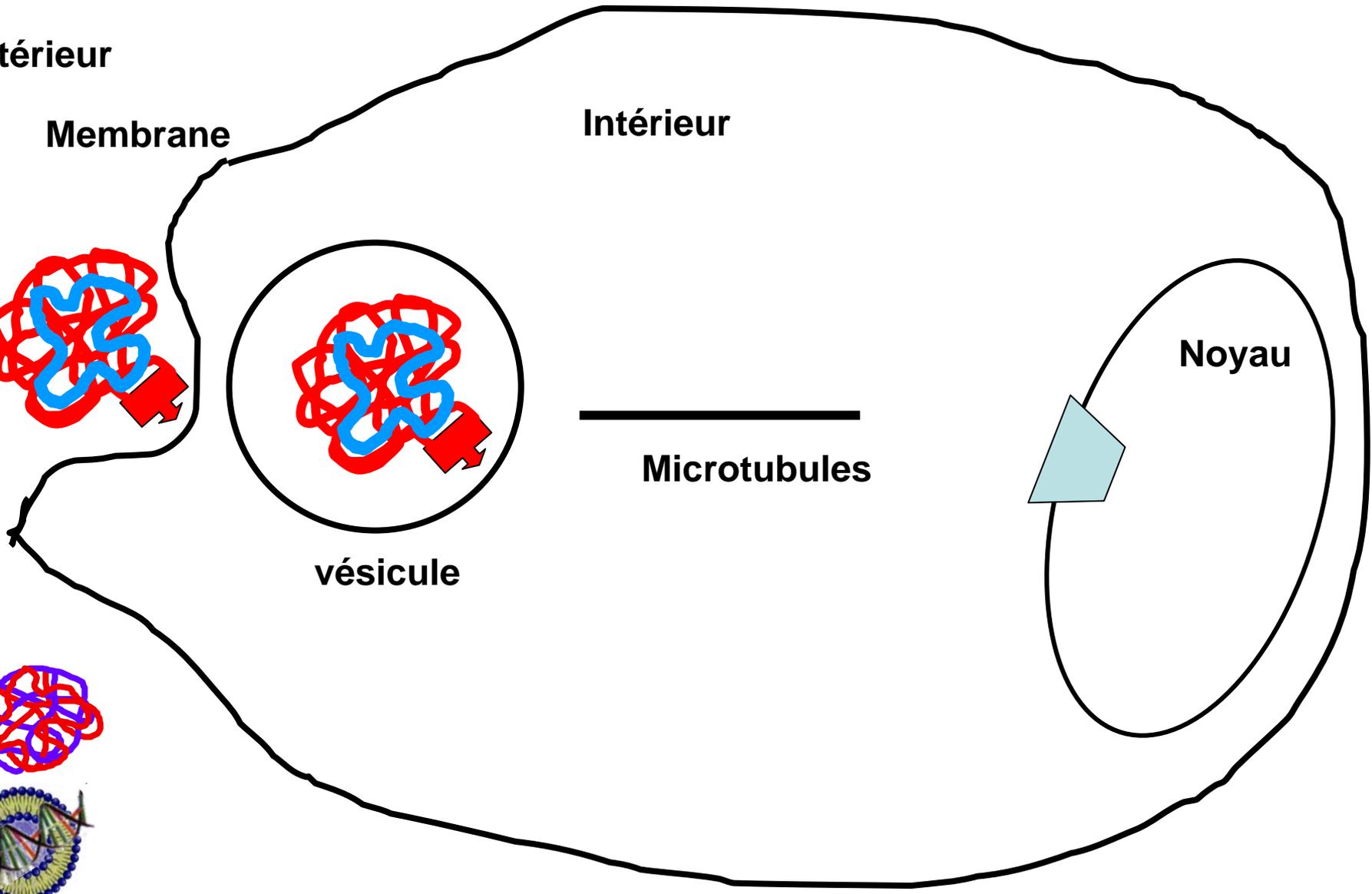
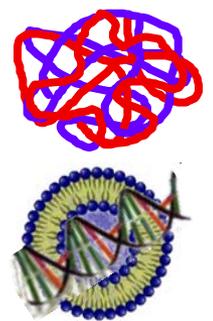
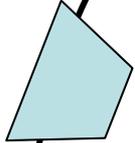
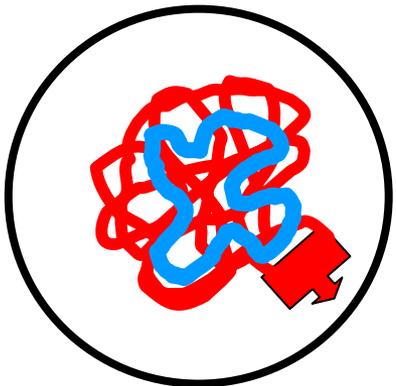
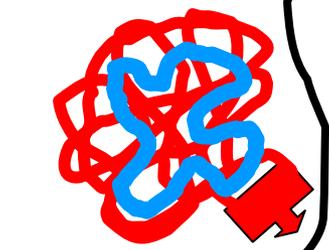
Membrane

Intérieur

Noyau

Microtubules

vésicule



Virus artificiel

Extérieur

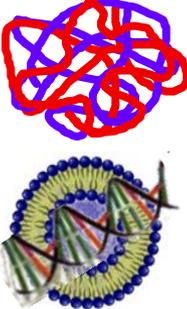
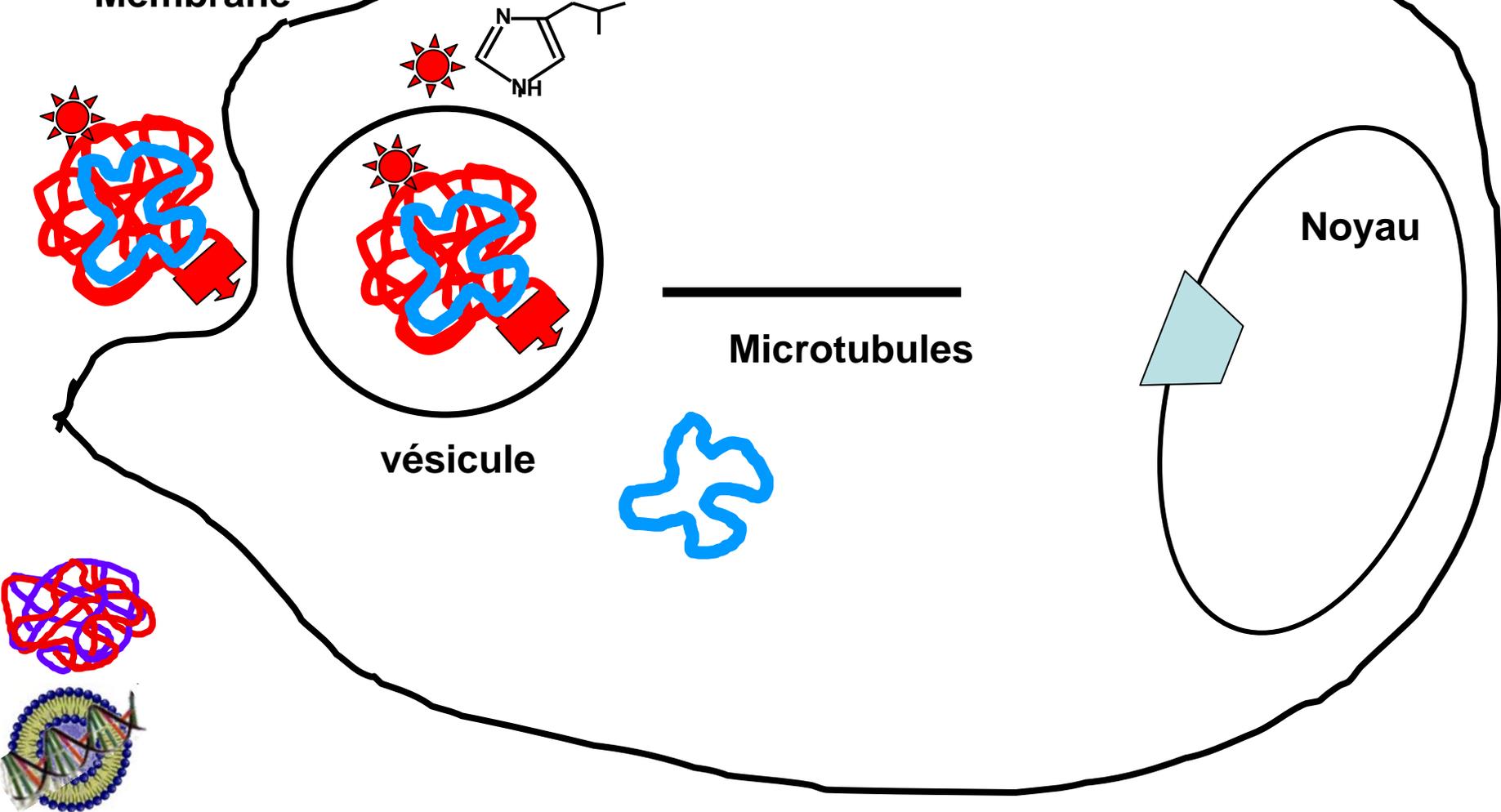
Membrane

Intérieur

Noyau

vésicule

Microtubules

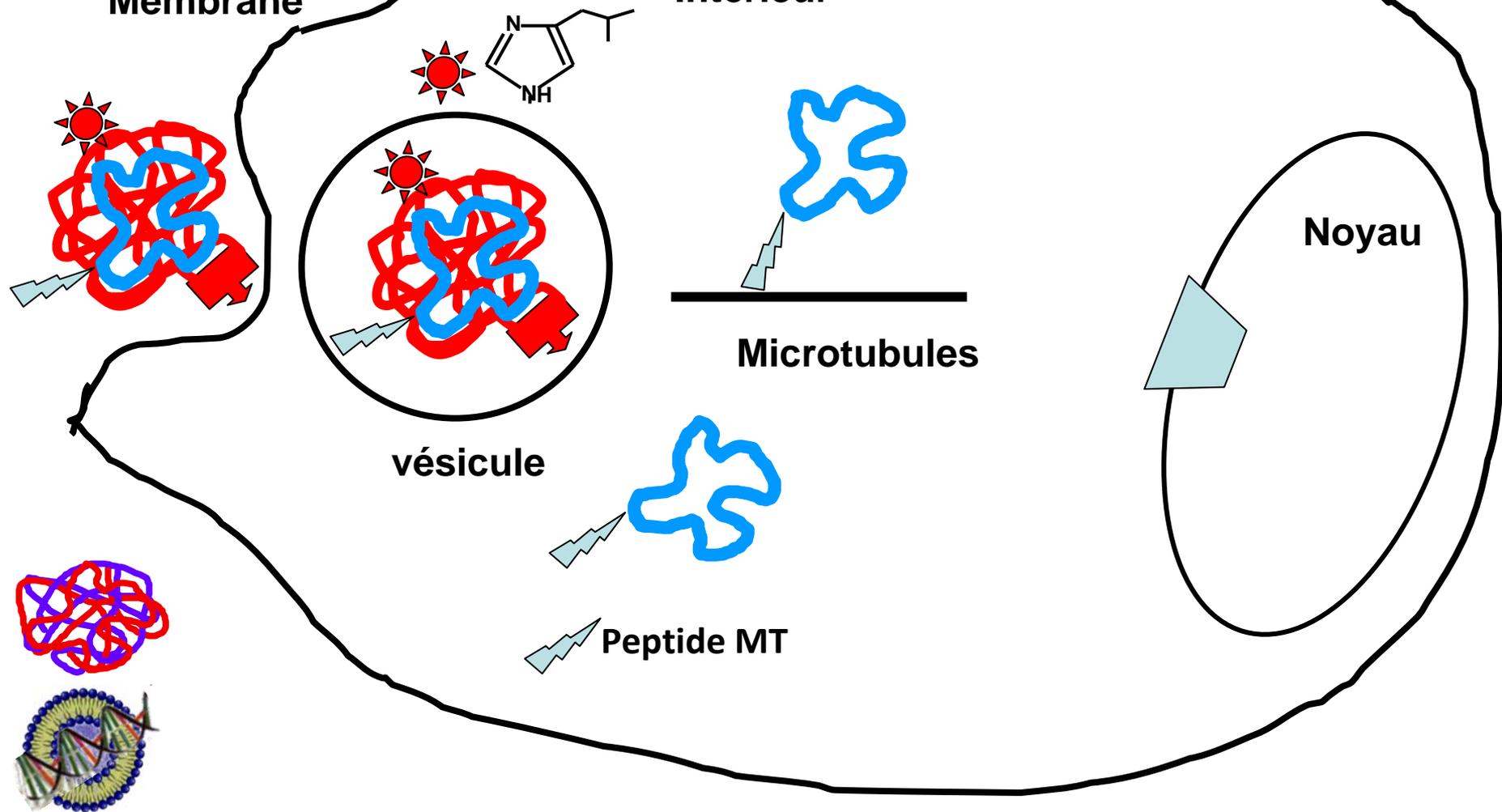


Virus artificiel

Extérieur

Membrane

Intérieur

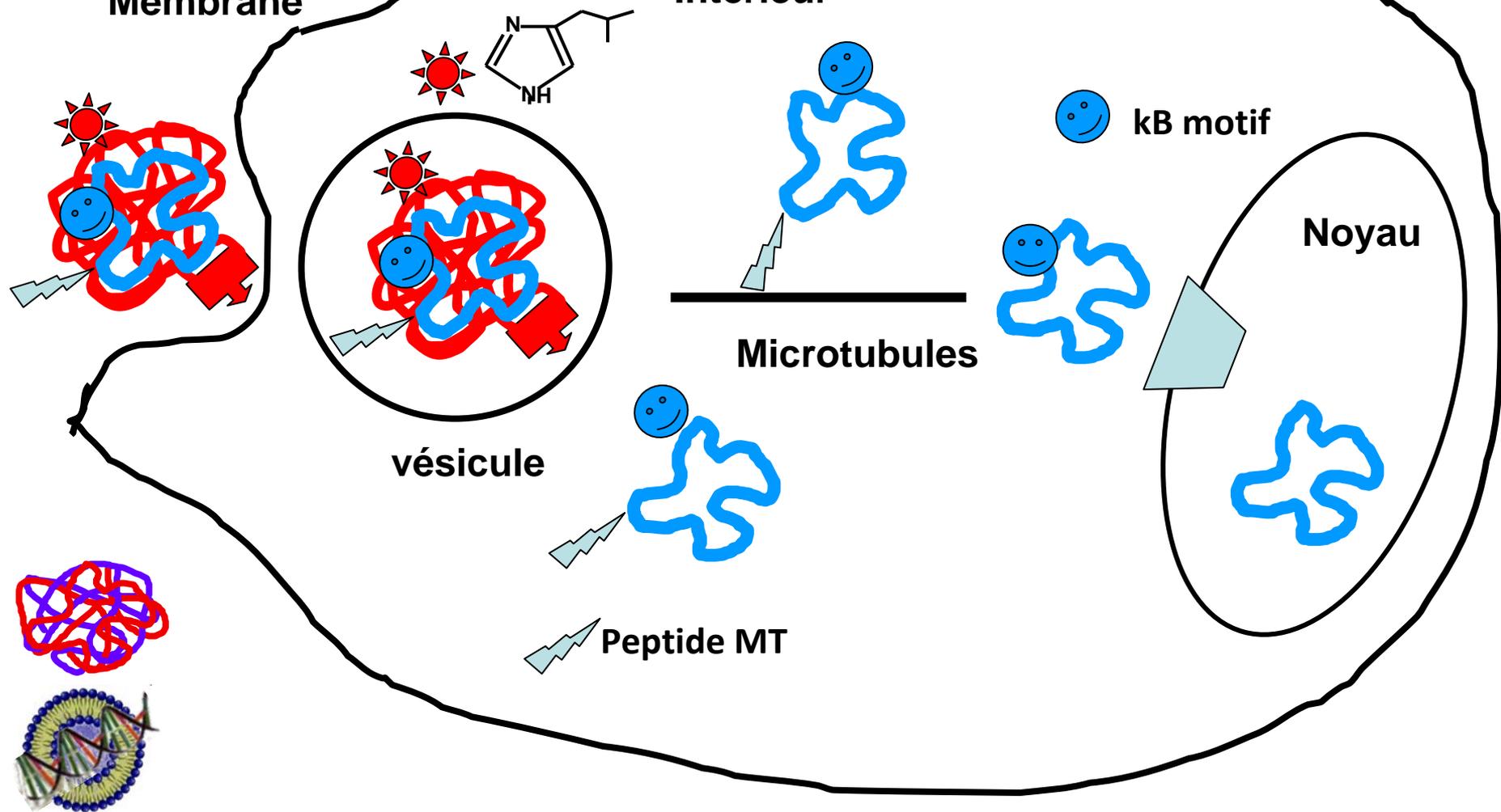


Virus artificiel

Extérieur

Membrane

Intérieur



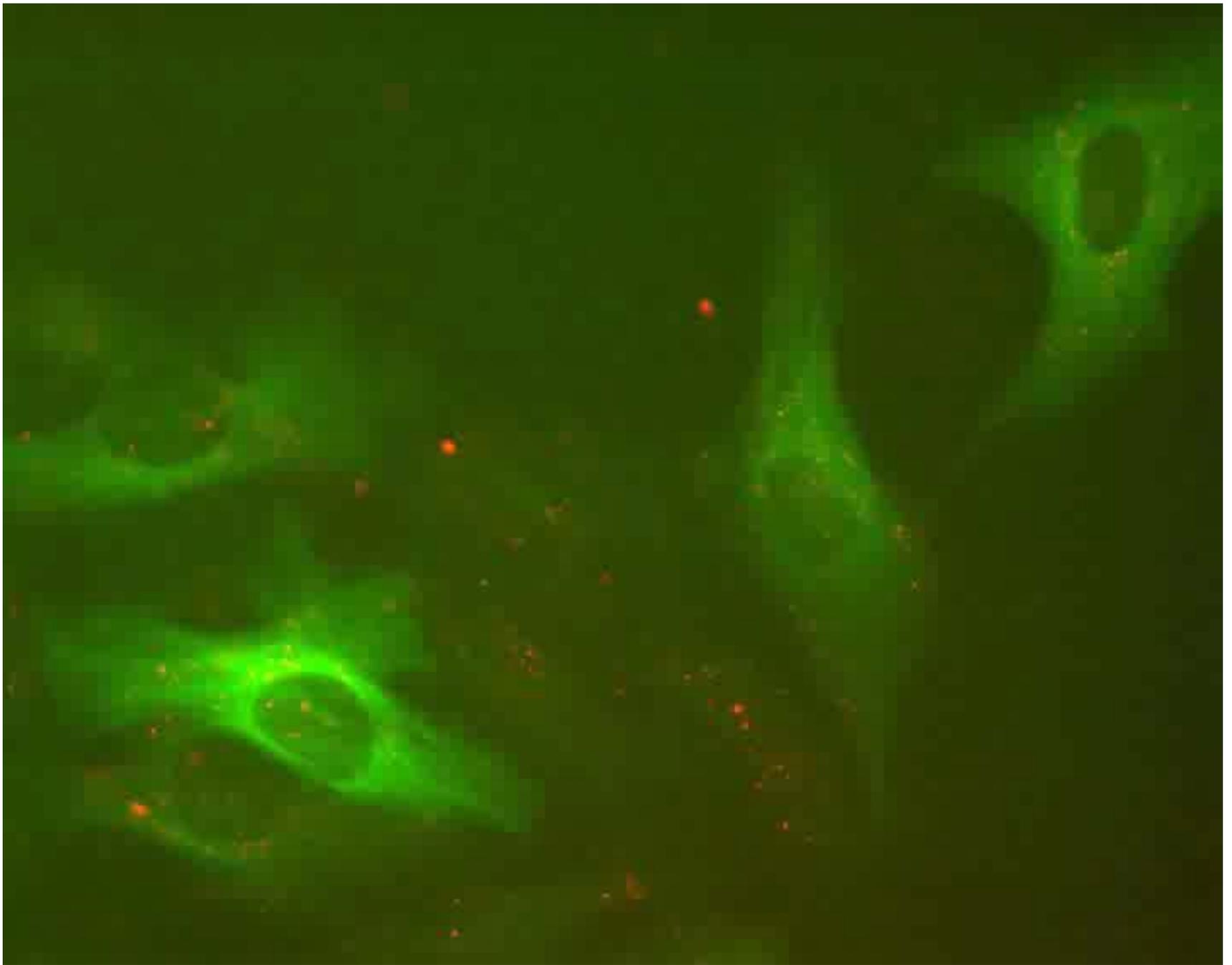
kB motif

Noyau

Microtubules

vésicule

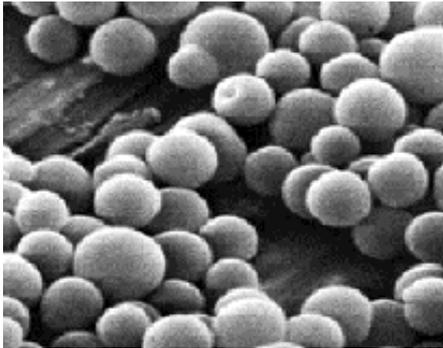
Peptide MT



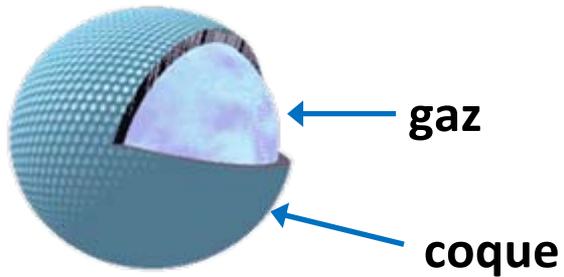
Méthodes physiques

Sonoporation

Ultrasons et bulles de gaz



Microbulles de gaz



Diamètre: 3 μm

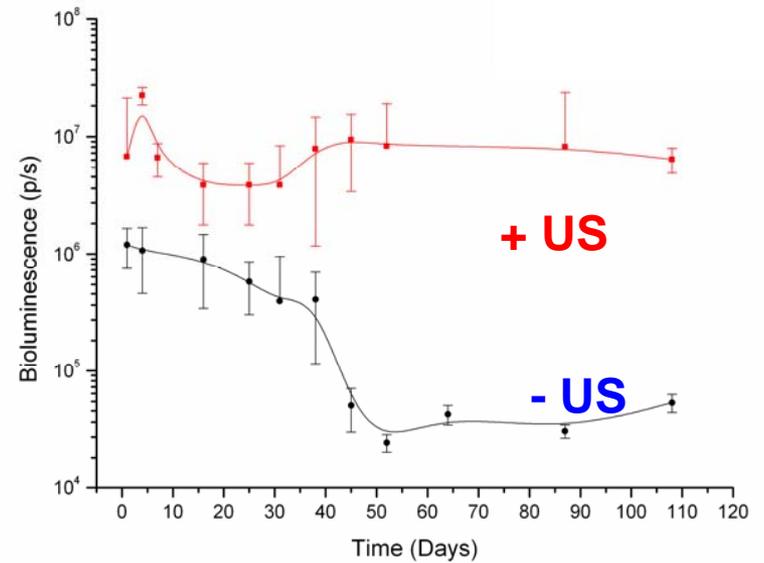
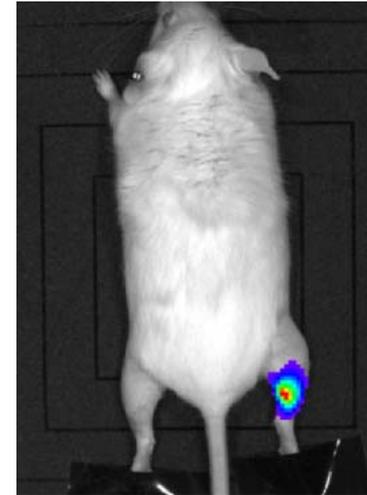


Injection du gène et des bulles dans tendon d'Achilles



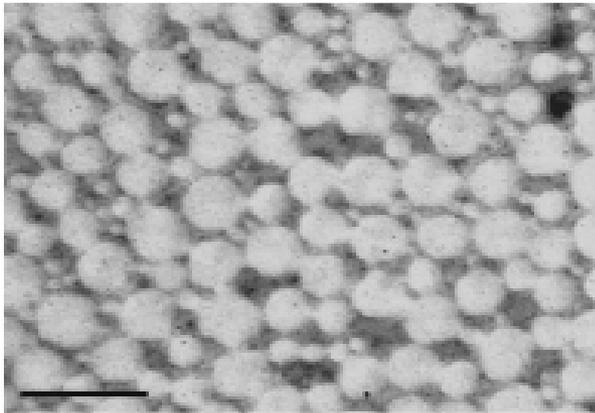
application des US

Expression du gène

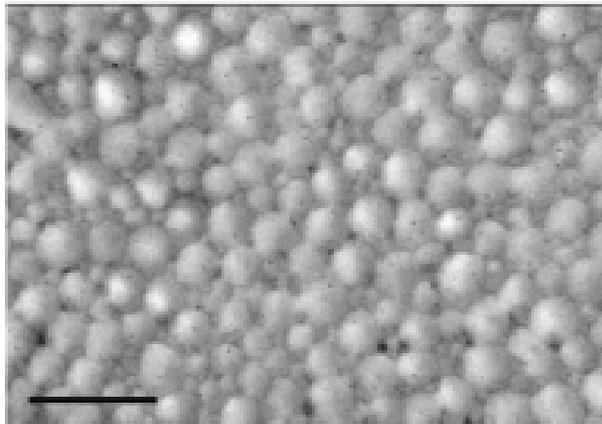
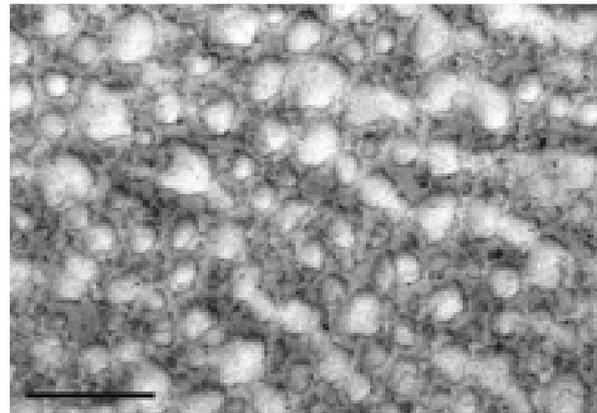


Régénération des fibres de collagène dans le tendon d'Achille

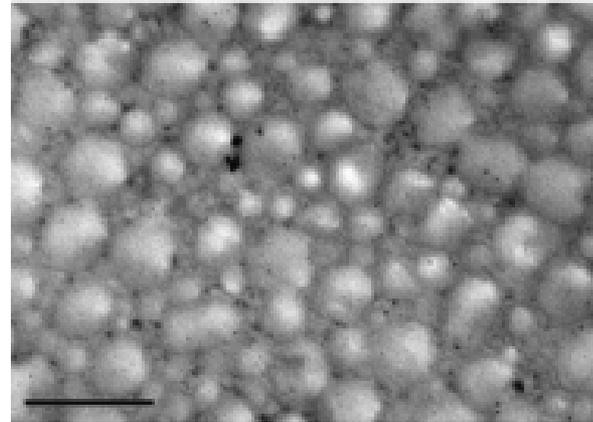
Tendon normal



Tendon fmod KO



Tendon fmod KO
US + bulles + gène fmod



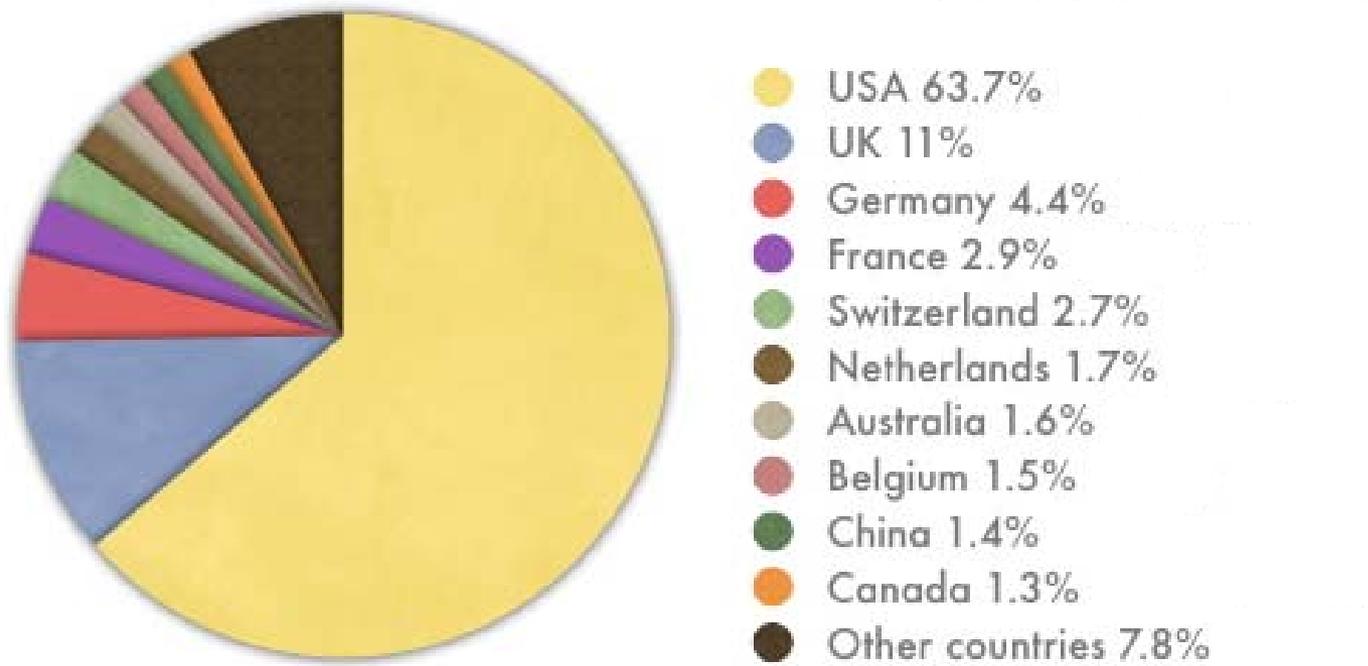
Tendon fmod KO
bulles + gène fmod

Thérapie Génique

Les succès

Essais cliniques

Répartition géographique



www.wiley.co.uk/genmed/clinical

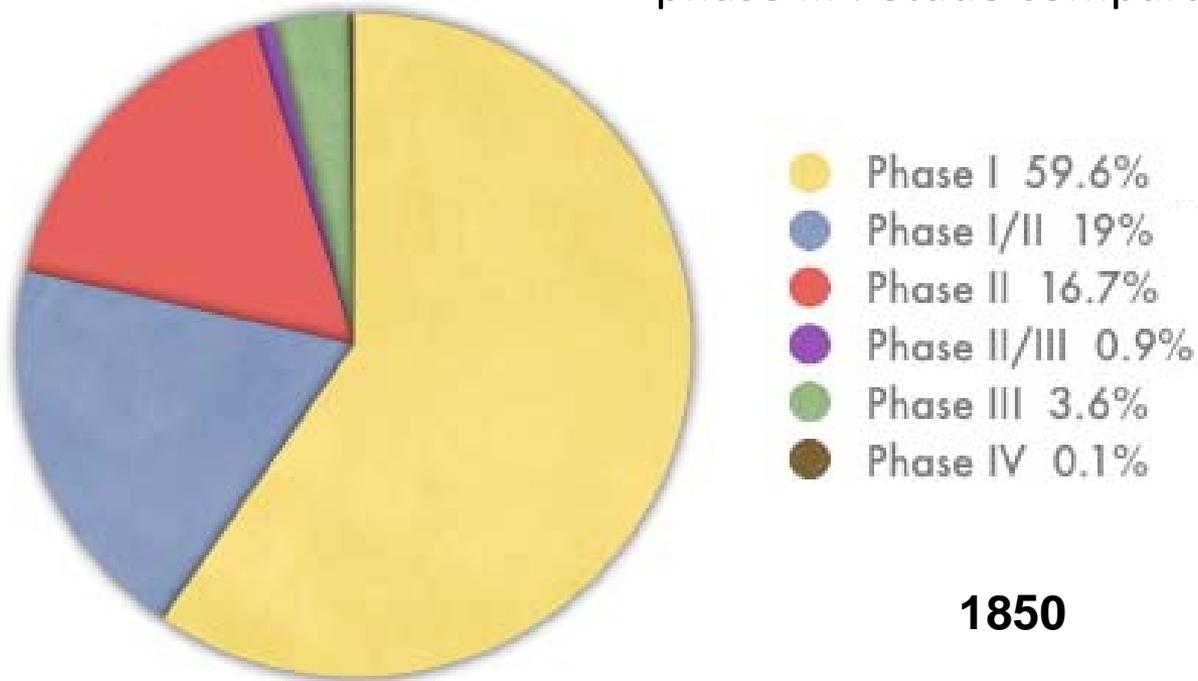
1850

Essais cliniques

phase I/II : évalue la faisabilité/toxicité

phase II/III : évalue l'efficacité.

phase III : étude comparative de l'efficacité



1850

Maladies Rares

Il en existe entre 5 000 et 8 000.

Environ 80 % sont d'origine génétique.

65 % sont graves et invalidantes

Prévalence faible, entre 1/1000 et 1/200000.

4 à 6% de la population, soit 3 millions de Français et 25 à 30 millions d'Européens.

sclérose latérale amyotrophique 8 000

mucoviscidose 5 000 à 6 000

myopathie de Duchenne 5 000

maladies lysosomales > 2 500

leucodystrophie 400 à 500

Maladies Rares et Maladies Génétiques

1 gène défectueux → une maladie

solution: remplacer le gène défectueux

Dystrophie musculaire des ceintures : Alpha ou gamma-sarcoglycane

Myopathie myotubulaire : la myotubularine

Leucodystrophies: ABCD1 (Transporteur transmembranaire)

Epidermolyse bulleuse : collagène VII ou laminine

Déficits immunitaires combiné sévère lié au déficit en adénosine déaminase, l'ADA-SCID : Adénosine déaminase (ADA).

Bêta-hémoglobinopathies : β -globine.

Pathologies de la rétine amauroses : Enzyme RPE65

Maladie de Crigler-Najar de type 1

UGT1A1 : UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 1 POLYPEPTIDE A1

Maladies lysosomales, Mucopolysaccharidoses

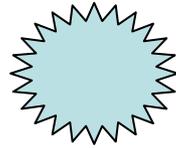
Maladie de San Filippo : NAGLU N-Acétyleglucosaminidase; SGSH

Enzyme activateur des sulfatases



2 stratégies

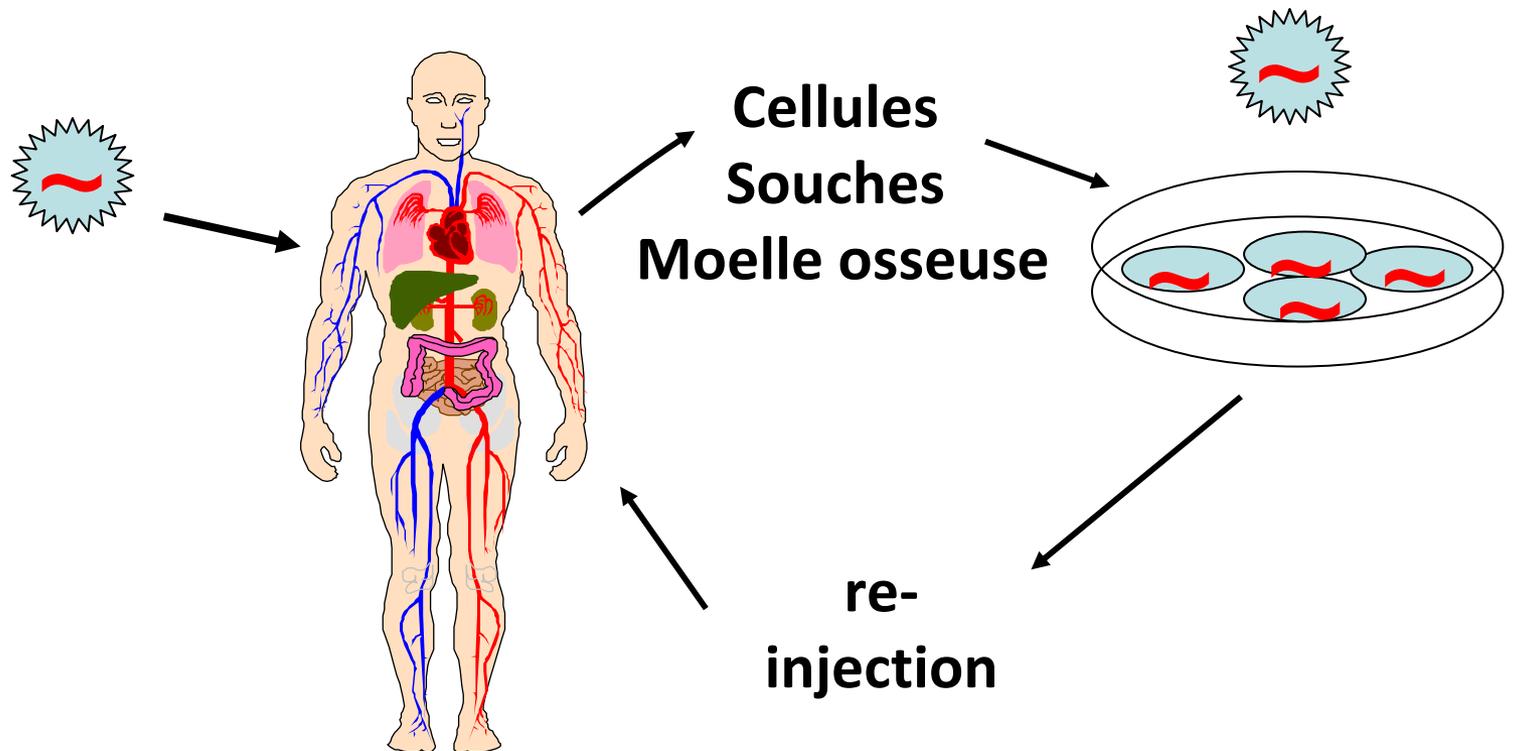
gène ~



vecteur

*Thérapie Génique
In vivo*

*Thérapie Génique et Cellulaire
ex vivo*



Société Européenne de Thérapie Génique et Cellulaire
Société Française Thérapie Génique et Cellulaire
20^{ème} anniversaire
Le 29 Octobre 2012, Versailles, France



Succès de la Thérapie génique (ex vivo)

2000

Déficits immunitaires

'enfants bulles' porteurs d'un grave déficit immunitaire combiné lié au chromosome X (SCID)

Mutations du gène codant pour la sous-unité γ c qui conduisent à un défaut complet de développement des lymphocytes T et des cellules natural killer. Létale au cours de la première année de vie en l'absence de greffe de moelle osseuse allogénique.



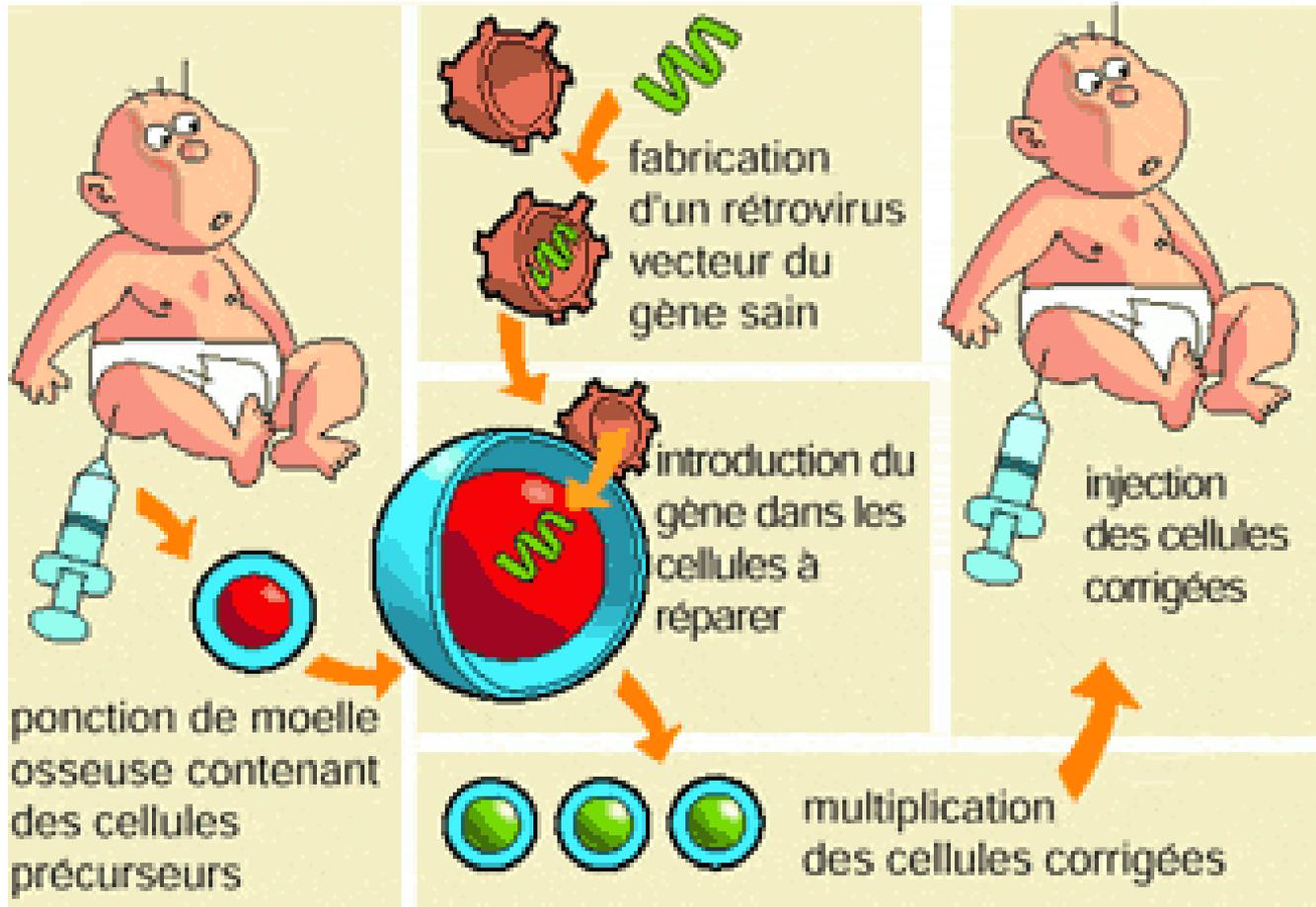
(Alain Fischer et Marina Cavazzana-Calvo Necker France).

Succès de la Thérapie génique (ex vivo)

2000

Déficits immunitaires

gène codant pour la sous-unité γ_c



France + Angleterre : une vingtaine d'enfants traités par thérapie génique.

Succès de la Thérapie génique (*ex vivo*)

Déficits immunitaires

2002

Leucodystrophies

Thérapie génique *ex vivo* avec des cellules hématopoïétiques génétiquement modifiées avec le gène de l'adénosine déaminase (ADA) .

Pour l'ADA-SCID, l'essai italien mené au TIGET (Milan) a permis de traiter avec succès 12 enfants atteints.

Succès de la Thérapie génique (ex vivo)

2009

l'adréno-leucodystrophie (ALD)

L'ALD est une maladie génétique rare du groupe des leucodystrophies.

Sa forme la plus grave et la plus fréquente entraîne une destruction de la myéline du cerveau.

Résulte d'une mutation du gène ABCD1 localisé sur le chromosome X.

L'équipe française du Pr Aubourg et du Dr Cartier
(Hôpital Saint-Vincent de Paul, Inserm)

Deux enfants ont été traités avec succès avec le gène ABCD1 dans un vecteur dérivé du virus VIH.

2011

Succès de la Thérapie génique (in vivo)

Maladie de Parkinson

Plus de 100 000 personnes en France

Des chercheurs français (hôpital Henri-Mondor) et britanniques ont réussi à améliorer les symptômes de la maladie de Parkinson chez 15 patients atteints d'une forme avancée de la maladie, avec des résultats encourageants.

Injection de trois gènes essentiels pour la synthèse de la dopamine dans le cerveau grâce à un vecteur viral, un lentivirus équin rendu inoffensif dans le cerveau.

un an après, leur motricité s'est améliorée et le traitement est bien toléré.

Succès de la Thérapie génique (in vivo)

2011

Hémophilie B

Maladie génétique héréditaire touchant 1 garçon sur 30 000 naissances. En France, on dénombre environ 5 200 hémophiles B, dont 2 000 présentant une forme sévère de la maladie.

Une équipe anglo-américaine a réussi à guérir durablement quatre patients atteints d'hémophilie B.

Injection directe d'un virus atténué transportant le gène codant le facteur IX de la coagulation, faisant défaut dans l'hémophilie B.

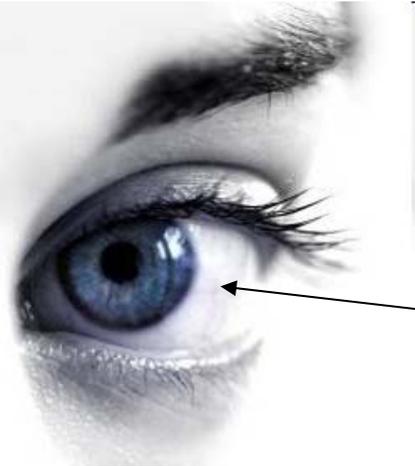
Le virus a rejoint les cellules du foie qui se sont mises à synthétiser le facteur IX, rétablissant ainsi le fonctionnement normal de la coagulation sanguine.

Avec plusieurs mois de recul, l'essai clinique a bien fonctionné chez quatre patients sur six.

Succès de la Thérapie génique (in vivo)

Maladies de la rétine

l'amaurose congénitale de Leber est une maladie héréditaire des yeux liée au gène *RPE65*, marquée par un déficit des photorécepteurs. qui conduit généralement à la cécité à l'âge adulte.



RPE65/AAV

12 patients, dont quatre enfants âgés de 8 à 11 ans, La réception de la lumière et l'extension du champ visuel ont été améliorées chez tous les patients, mais les meilleurs résultats sont obtenus chez les enfants. Ceux-ci ont pu de nouveau déambuler dans une pièce comportant des obstacles, même avec peu de lumière.

Cette amélioration s'est maintenue sur les deux ans qu'a duré l'étude.

Aujourd'hui, pratiquement toutes les maladies sont susceptibles d'être traitées un jour par une thérapie génique.

Thérapie Génique et cancer

Stratégies

Stimulation des réactions de défense normales :

- Injection dans les lymphocytes d'un gène exprimant une cytokine (Interleukine II) substance qui détruira les cellules cancéreuses, appelée.

- Vaccination antitumorale

Injection dans la cellule tumorale d'un gène antigène afin d'augmenter les réactions de défense immunitaire

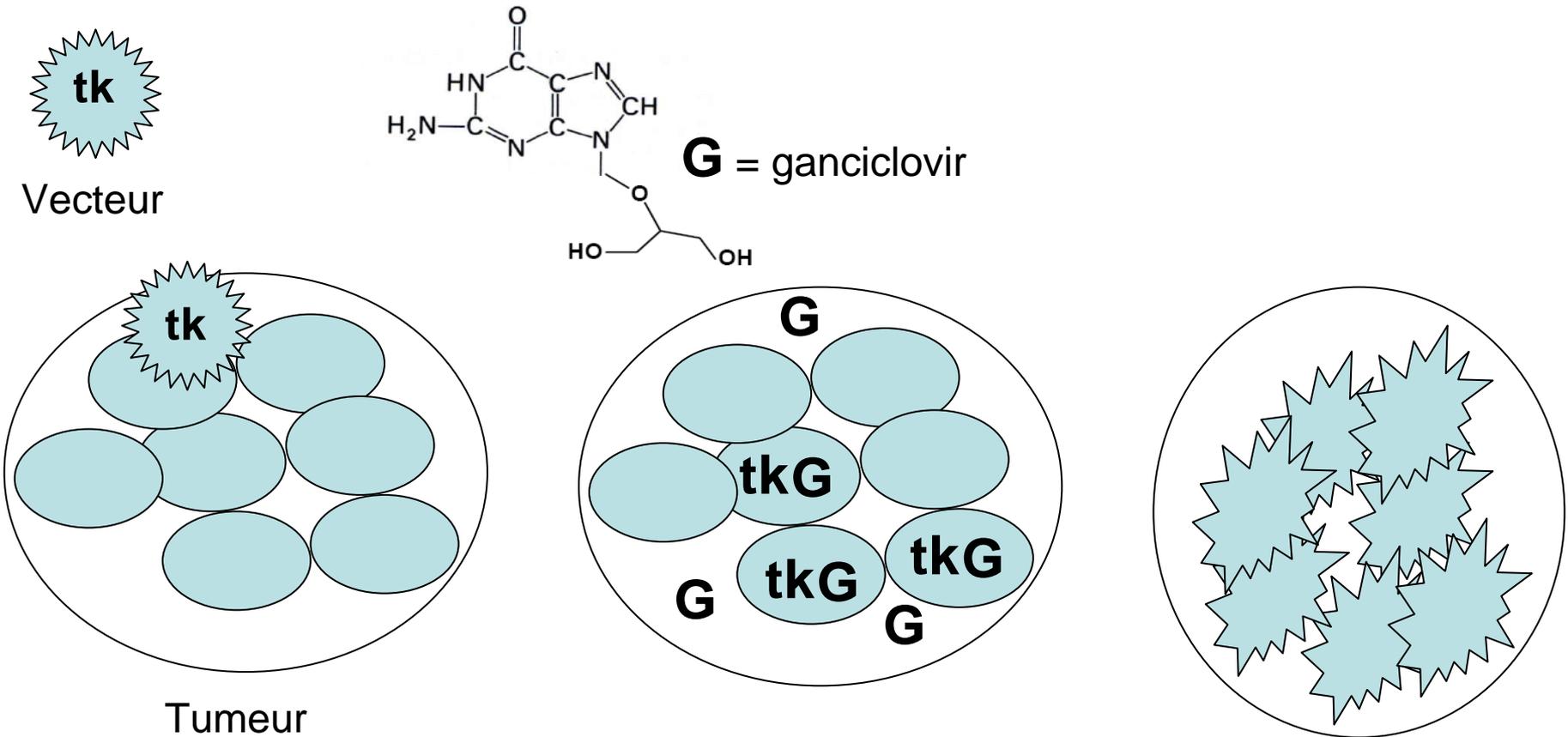
Gène suppresseur de tumeur: L'introduction du gène p53 naturel dans les cellules tumorales pour bloquer la division des cellules.

Gène "suicide". Injection dans la cellule tumorale d'une enzyme la rendant sensible à un agent toxique.

Thérapie génique et cancer : Gène Suicide

Activation spécifique d'une pro-drogue **G** non toxique en drogue **cytotoxique** uniquement au sein des cellules tumorales transfectées avec le gène suicide.

Gene suicide tk = thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV) de type 1



Des essais de phase III sont en cours dans le traitement du glioblastome.

Stratégies Innovantes

THÉRAPIE GÉNIQUE

1- Transfert du gène

2- Techniques émergentes:

La chirurgie du gène

Réparer le gène lui-même.

Apparues il y a moins d'une dizaine d'années

Techniques très pointues déjà à l'essai chez l'Homme.

- Le saut d'exon

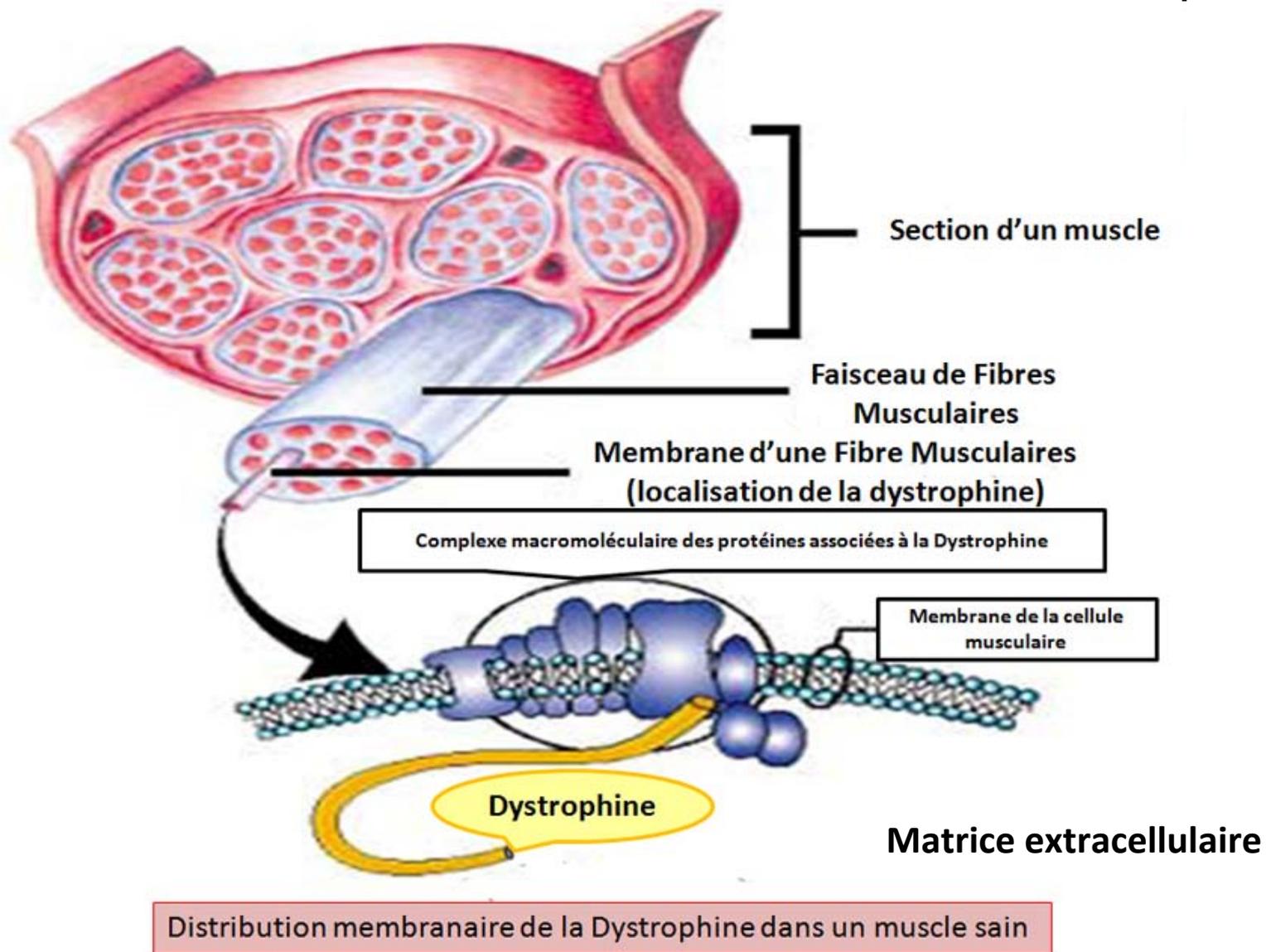
- Méganucléases

Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

La myopathie de Duchenne est la maladie génétique des muscles squelettiques la plus courante.

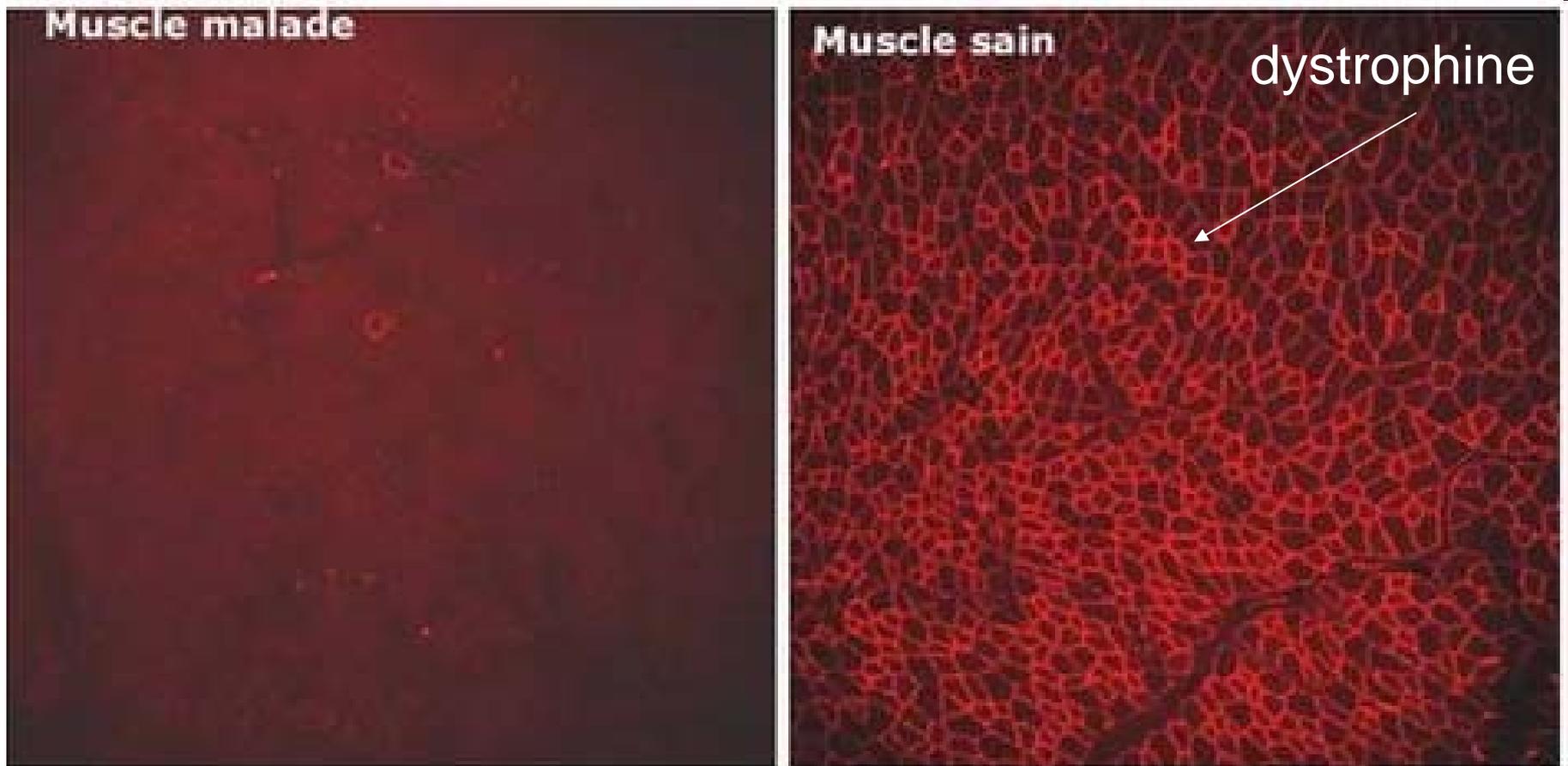
Fréquence de une pour 3.500 naissances chez les garçons, soit environ 40.000 cas aux Etats-Unis et en Europe Occidentale.

En France: **5 personnes sur 100 000 soit 2500 à 3000 personnes.**

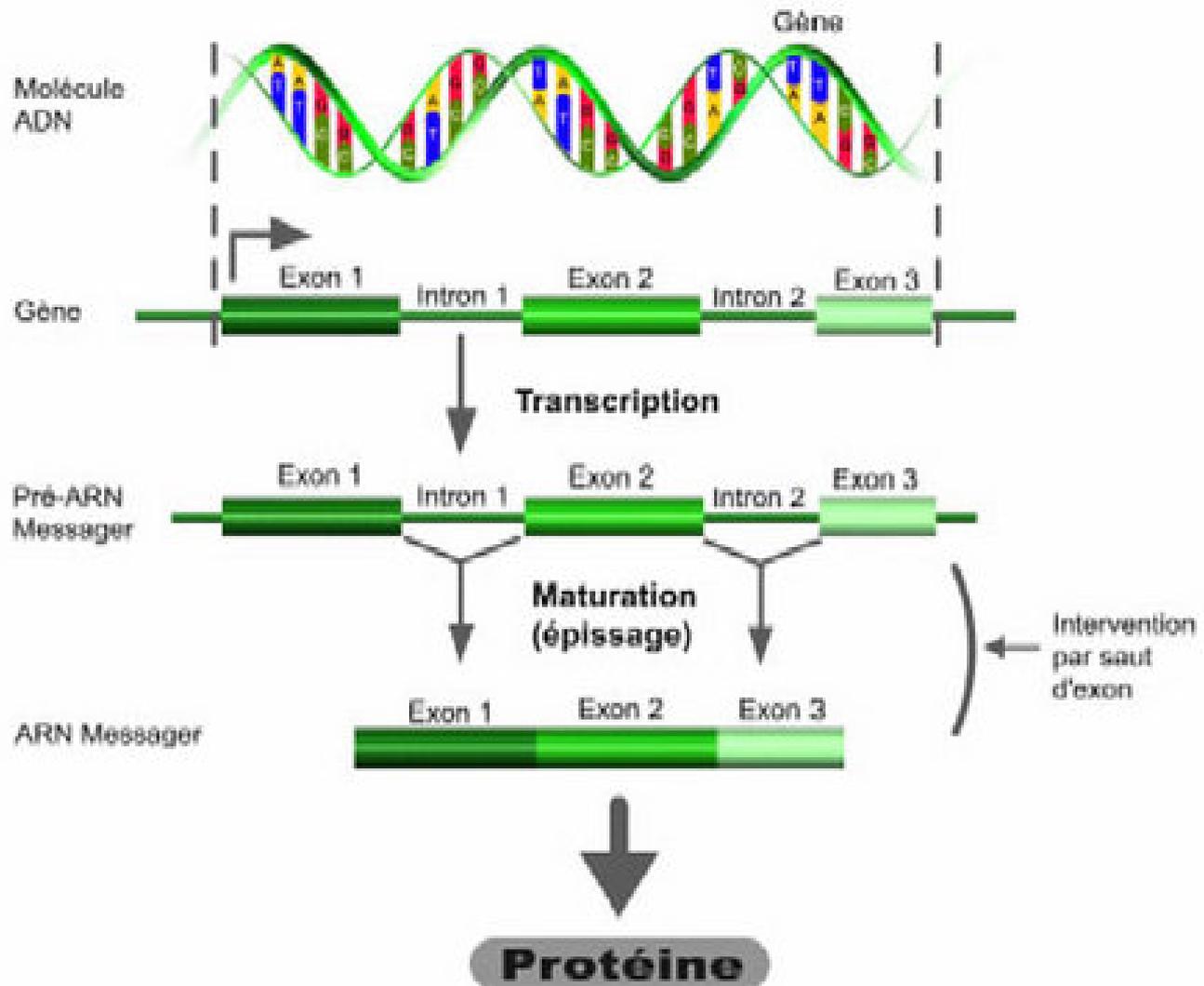


Le déficit en **dystrophine** est à l'origine de la maladie de Duchenne.

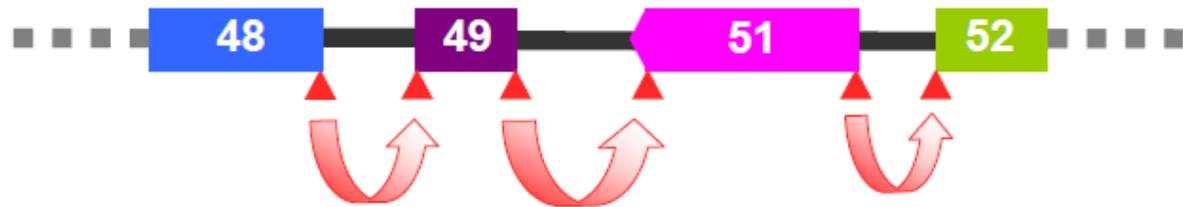
Le déficit en **dystrophine** est à l'origine de la maladie de Duchenne.



Du gène à la protéine

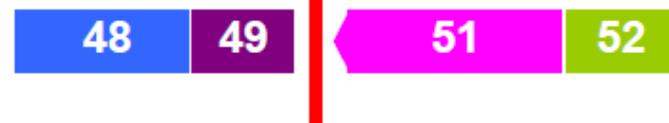


ARN pré-messager
déléte de l'exon 50



épissage : élimination des introns

ARN messager mûr
non fonctionnel



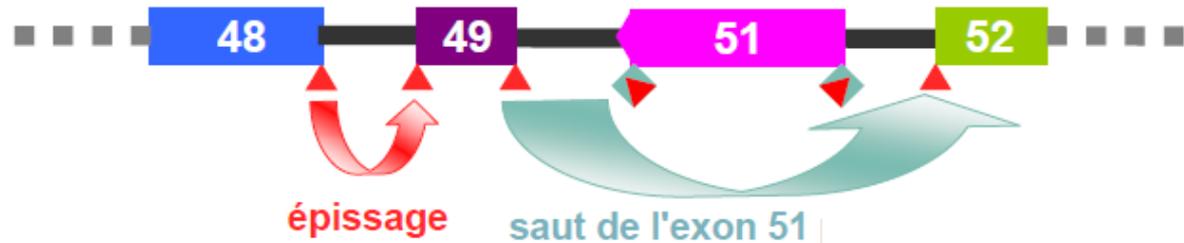
message illisible

X

Pas de dystrophine

La délétion de l'exon 50 du gène DMD provoque un décalage du cadre de lecture.
La dystrophie musculaire de Duchenne résulte dans 65% des cas du manque (délétion), dans le gène DMD codant la dystrophine, d'un ou plusieurs exons provoquant un décalage du cadre de lecture (ici, il s'agit de l'exon 50) : la dystrophine n'est pas synthétisée.

ARN pré-messager
déléte de l'exon 50



ARN messager mûr
fonctionnel



Dystrophine raccourcie mais
fonctionnelle

▲ : sites d'épissage

▲ : oligonucléotides anti-sens ciblés

Le saut de l'exon 51 rattrape un cadre de lecture fonctionnel en éliminant un ou plusieurs exons de l'ARN pré-messager anormal.

Certes, la dystrophine produite est plus courte (quasi-dystrophine), mais elle est fonctionnelle. Pour induire un saut d'exon, les chercheurs interviennent au niveau de la réaction d'épissage de l'ARN à l'aide de petits ARN artificiels anti-sens (oligonucléotides anti-sens) spécifiques des exons qu'ils cherchent à exclure.

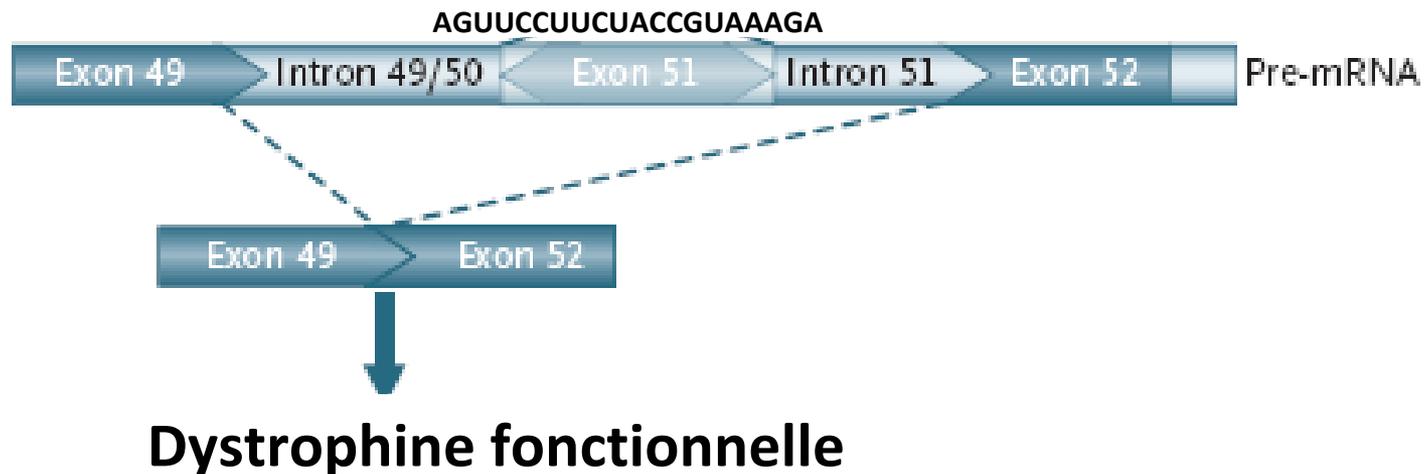
Le saut d'exon

Petits ARN antisens

PRO051 est une molécule d'ARN de 20 nucléotides

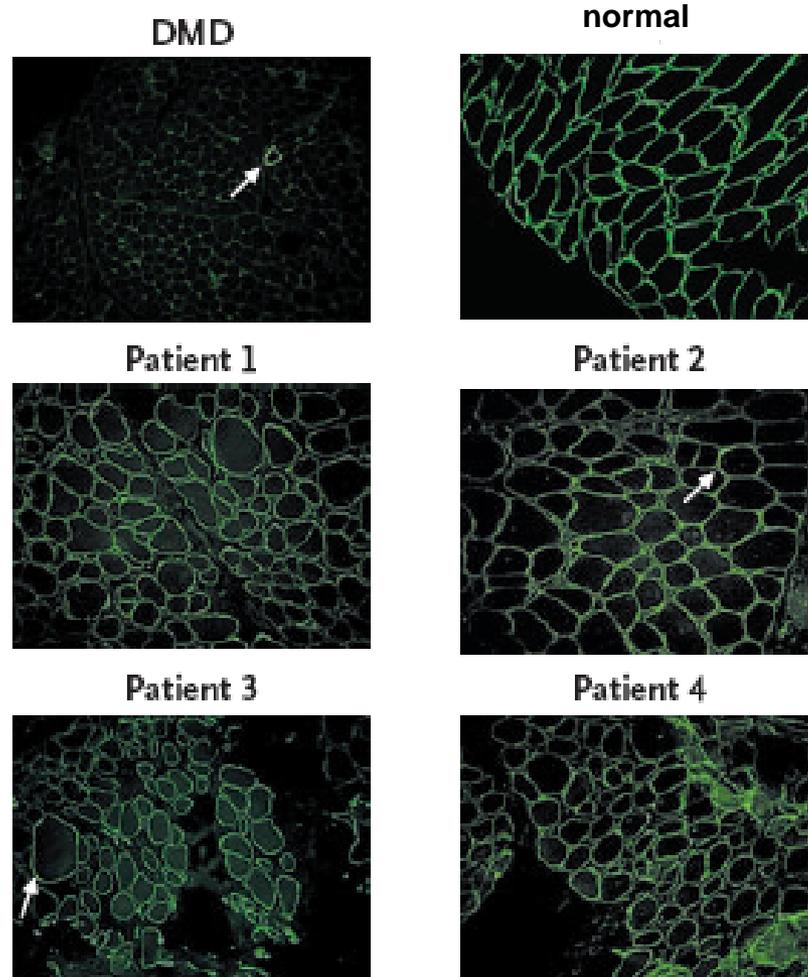
5'-UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU-3'

UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU



Effet d'une simple dose de l'oligonucléotide antisens PRO051 (0,8 mg) en intramusculaire

Biopsies après 28 jours



Le gène dystrophine est porté par le chromosome X et fait 2,4 Mb.

Il code un ARNm de 14 kb qui contient **79 exons**

DMD: **6 exons** défectueux (45, 53, 51, 44, 50 et 8)

Exon 51: 13 % des patients souffrant de DMD.

40 % environ des patients atteints de DMD pourraient bénéficier
du saut exon



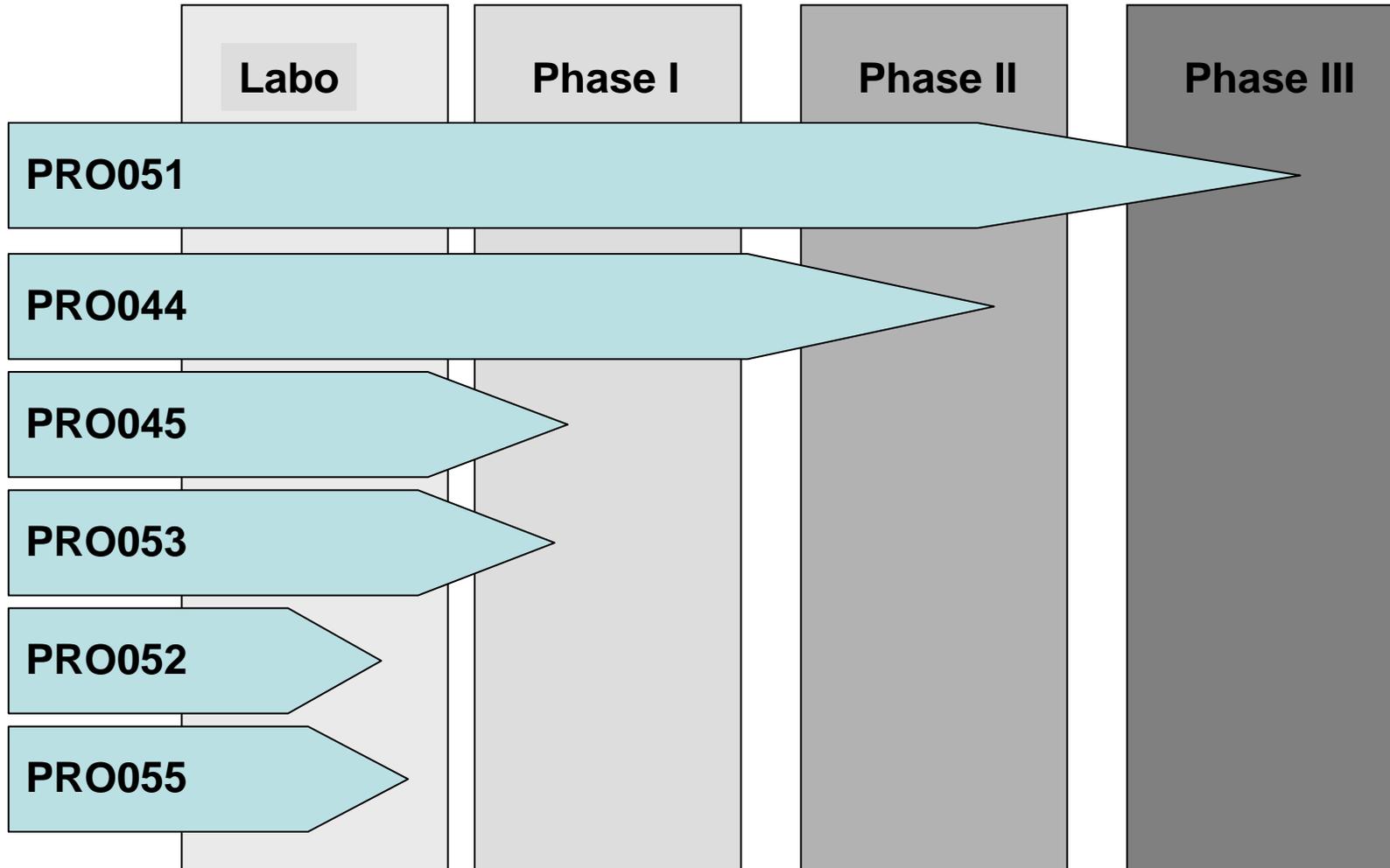
PRO051



Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

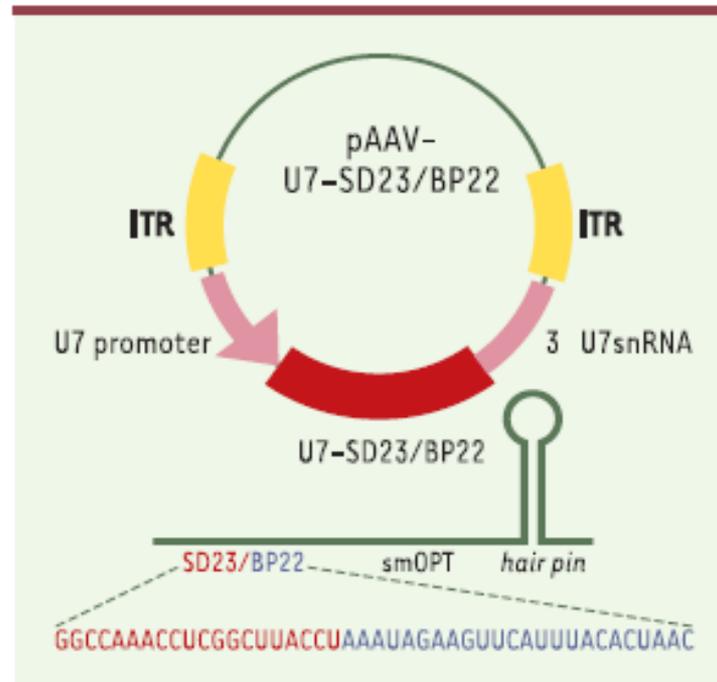


Essais Cliniques saut d'exon

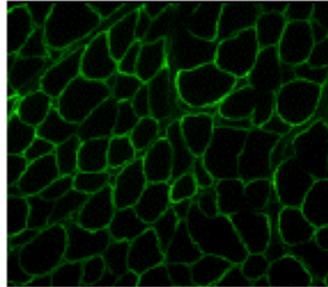


Dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker

Pré-clinique / Saut d'exon par injection d'un virus AAV transportant le gène U7 associé à un ARN anti-sens (AAV-U7)



Administration intramusculaire ou la perfusion de la patte antérieure de chiens GRMD par des snARN U7 un vecteur AAV1.



- Expression de la dystrophine restaurée dans les fibres musculaires transduites
- Altérations dystrophiques corrigées
- Force musculaire partiellement restaurée.

Conclusion

Essais cliniques de plus en plus nombreux

Résultats très positifs

Pour maladies génétiques ou non

Rendre les vecteurs viraux les plus inoffensifs possibles

Ou les remplacer par des vecteurs synthétiques

Multidisciplinarité de la recherche

**Chimie, biologie cellulaire,
biologie moléculaire, physique**

Conclusion

La thérapie génique: ça marche

TÉLÉTHON



**7 ET 8
DÉCEMBRE
2012**



Transfert d'acides nucléiques par des systèmes non viraux



Patrick Midoux
Chantal Pichon

Jean Marc Malinge

Jean-Pierre Gomez

Patrick Baril

Anthony Delalande

Cristine Goncalves

Virginie Malard

Chloé Leduc

Thomas Thibault

Lucie Pigeon

Safia Ezzine

Marie-Pierre Gosselin

David Gosset



Mahajoub Bello-Roufai

Michael Mockey

Eric Mennesson

Gilles Breuzard

Loic Lebègue

Federico Perche

Julie Lodewick

Ludivine Billiet

Benoit Maury



Inserm