

Cours de Génétique (option)
04/04/2008
Pr. Tournier Lasserre
Ronéotypeur : Uzma Ishaque

LES APPROCHES THERAPEUTIQUES DANS LES MALADIES GENETIQUES

PLAN :

INTRODUCTION

I/ THERAPEUTIQUES SYMPTOMATIQUES

II/ LIMITER L'ACCUMULATION DE PRODUIT TOXIQUE

- 1/ Régime restrictif : Exemple de la phénylcétonurie (PCU) :
- 2/ Elimination d'un produit accumulé : Exemple de la cystinose (non traité)
- 3/ Inhibiteurs métaboliques empêchant l'accumulation de produit toxique :
Exemple de la maladie de Gaucher :

III/ INDUIRE L'ACTIVITÉ D'UNE PROTEINE (Exemple de l'homocystinurie)

IV/ GREFFE DE MOELLE OSSEUSE ALLOGENIQUE

V/ GREFFES D'ORGANES : (Exemple de la mucoviscidose)

VI/ THERAPIE GENIQUE

TRANSFERT DE GÈNE

- 1/ Nature et conséquences des mutations (rappel) :
- 2/ Transfert de gènes (multiples questions) :
- 3/ Les vecteurs :
- 4/ Les approches ex vivo et in vivo :
- 5/ Exemples de déficits immunitaires combinés sévères (SCID) :
Déficit en adénosine désaminase :
SCID lié à l'X :
- 6/ Bilan et Leçons :

VII/ THERAPIES CIBLEES DERIVEES DE LA CONNAISSANCE DES GENES

- 1/ Actions ciblée sur les transcrits ARN – Approche visant à dégrader l'ARN muté :
- 2/ Stratégies basées sur la modification des ARN – modification de l'épissage d'un ARN ou de sa traduction :
- 3/ Actions ciblées sur la/les protéine(s) – thérapies substitutives : apport de la protéine manquante :

VIII/ RECHERCHES ET PERSPECTIVES

THERAPIE CELLULAIRES

- 1/ Cellules souches :
- 2/ Cellules souches et thérapeutique des maladies génétiques : Ex : Chorée de Huntington :

CONCLUSION

INTRODUCTION

Il existe plus de 7000 maladies rares qui touchent tous les organes. Les thérapies sont donc multiples. Mais on n'a pas encore beaucoup de maladies rares génétiques dans lesquelles on a des thérapies efficaces. De très nombreux programmes de recherche sont développés actuellement par différentes approches.

Les stratégies thérapeutiques :

Thérapies qui existaient bien avant que les gènes de certaines maladies ne soient identifiés :

- Très variables selon la maladie, le type de mutation
- Non mutuellement exclusives (on peut combiner plusieurs thérapeutiques. Ex : combiner une thérapeutique symptomatique avec une greffe de moelle osseuse)
- Thérapeutiques symptomatiques (traiter les symptômes pour améliorer le confort du malade et son état de santé sans avoir traité réellement la maladie)
- Thérapeutiques visant à éliminer un produit toxique ou à augmenter l'activité d'une protéine mutée ayant une activité résiduelle
- Greffe de moelle osseuse allogénique
-

Thérapies mettant en jeu la connaissance des gènes : (la difficulté dans le futur sera de trouver des médicaments conventionnés :

- Transfert de gène / thérapie génique
- Thérapies ciblées dérivées de la connaissance des gènes, des protéines codées par ces gènes et des mécanismes physiopathologiques

I/ THERAPEUTIQUES SYMPTOMATIQUES

Elles consistent en une prise en charge des complications multiviscérales des affections pour améliorer l'état des patients :

- Kinésithérapie (ex : dans la mucoviscidose)
- Antibiothérapie préventive (ex : mucoviscidose)
- Appareillages adaptés (ex : fauteuil roulant)
- Traitements pharmacologiques symptomatiques (ex : traitements anticoagulants par AVK dans le déficit en protéine S, ou encore l'utilisation de statines dans l'hypercholestérolémie familiale)
- Actes chirurgicaux (ex : en orthopédie)

II/ LIMITER L'ACCUMULATION DE PRODUIT TOXIQUE

Pour les maladies métaboliques +++.

Il existe trois manières de limiter cette accumulation :

1/ Régime restrictif : Exemple de la phénylcétonurie (PCU) :

La PCU est une maladie autosomique récessive.

Il naît environ 50 enfants phénylcétonuriques par an en France.

Il s'agit d'une maladie grave liée à un déficit en phénylalanine (Phe) hydroxylase (enzyme hépatique convertissant la Phe en Tyrosine).

La Phe va donc s'accumuler essentiellement dans le SNC entraînant, si la maladie n'est pas traitée, un retard mental très important, qui n'est pas présent à la naissance mais qui va apparaître sous forme de crises d'épilepsie.

Dans 98% des cas, la maladie est liée à une mutation de la Phe hydroxylase.

Elle entraîne donc un risque neurologique important avec un retard mental, des troubles du comportement, des crises d'épilepsie.

Il y a une accumulation progressive de Phe, en particulier dans le SNC. Il existe alors une très grande toxicité de cet excès de Phe pendant la vie embryonnaire et l'enfance (période où le cerveau mature). Elle est un peu moins importante une fois passé l'âge de 10 ans (important pour la mise en place du traitement).

Depuis 1970, on fait un dépistage systématique pour tous les enfants à risque.

Normes : Phénylalaninémie normale : [Phe] < 3 mg/100 mL

PCU typique : [Phe] > 20 mg/100 mL

Un dépistage positif entraîne la mise en place immédiate, dès les premiers jours de vie, d'un régime strict qui permettra, s'il est bien conduit, d'obtenir un développement neurologique NORMAL +++.

Il s'agit de l'instauration immédiate d'un régime restrictif dépourvu en Phe (fait de substituts alimentaires sans Phe) puis l'introduction très progressive de protéines naturelles en surveillant la phénylalaninémie plasmatique qui doit être maintenue entre 2 et 5 mg/100 mL.

Pour info : 2g de viande = 20 mg de Phe . La viande est donc interdite.

On poursuit ce régime pendant l'enfance et l'adolescence. Mais à partir de 10ans, il sera un petit peu moins strict.

Le régime strict doit être repris chez une femme phénylcétonurique lors d'une grossesse.

2/ Elimination d'un produit accumulé : Exemple de la cystinose (non traité par la prof)

3/ Inhibiteurs métaboliques empêchant l'accumulation de produit toxique : Exemple de la maladie de Gaucher :

La maladie de Gaucher est une maladie autosomique récessive.

Elle est due à un déficit en glucocérébrosidase qui entraîne des dépôts de glucosylcéramide dans différents organes, en particulier le foie, la rate, la moelle osseuse.

L'âge de début est très variable (entre 0 et 90 ans), mais dans 50% des cas, elle survient avant 10 ans.

Différents types :

Type 1 : (forme majoritaire avec 95% des cas) chronique, non neurologique. Dépôts très importants de glucosylcéramide dans la rate, entraînant une importante splénomégalie.

Type 2 : neurologique aiguë.

Type 3 : neurologique subaigu.

On peut traiter ces patients par une réduction de substrat, en utilisant un inhibiteur de

glucosylcéramide synthase (le miglustat).

III/ INDUIRE L'ACTIVITÉ D'UNE PROTEINE

Il s'agit encore de maladies métaboliques, avec un déficit enzymatique.
On traite par supplémentation en cofacteurs.

Exemple de l'homocystinurie: accumulation d'homocystéine liée à un déficit en cystathionine beta synthase. Ce déficit entraîne des troubles neurologiques (risque d'AVC chez des enfants, adolescents ou jeunes adultes), oculaires et osseux.

On améliore l'état en administrant de fortes doses de vitamine B6 qui est un cofacteur de l'enzyme cystathionine beta synthase dont il reste encore une faible quantité.

IV/ GREFFE DE MOELLE OSSEUSE ALLOGENIQUE

Si la protéine absente est normalement exprimée dans les cellules de la moelle osseuse, on peut faire chez les patients une greffe de moelle osseuse d'un sujet qui, lui, n'est pas muté. Mais ce genre d'intervention pose le problème de la compatibilité HLA (c'est pourquoi on va chercher la moelle osseuse plutôt chez un apparenté du patient).
On traite donc au préalable par une chimiothérapie pour mettre les patients en aplasie, de façon à ce qu'il n'y ait pas de réaction du greffé contre le greffon.

Cette thérapeutique s'adresse donc beaucoup aux maladies hématologiques et immunologiques.

On administre par voie veineuse une moelle osseuse histocompatible chez un patient préalablement en aplasie, dans le but de remplacer les cellules du sujet par les cellules de la moelle du donneur, qui vont synthétiser la protéine manquante.

Ces greffes concernent les déficits immunitaires combinés sévères, certaines formes très sévères de thalassémie, mais aussi certaines maladies métaboliques comme l'adénoleucodystrophie (maladie neurologique due à un déficit dans l'oxydation des acides gras).

Inconvénients :

- nécessité d'un donneur compatible.
- mortalité assez élevée : 10-15 % (il faut donc peser l'indication)

V/ GREFFES D'ORGANES :

Exemple de la mucoviscidose :

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive due à une mutation du canal chlore CFTR.

Les principaux symptômes sont : épaissement important des sécrétions bronchiques et pancréatiques, insuffisance pancréatique, diarrhée, retard de croissance, infections bronchopulmonaires à répétition, conduisant à une insuffisance respiratoire et au décès avant 30 ans.

Approches thérapeutiques :

- supplémentation en enzymes pancréatiques
- kinésithérapie respiratoire +++

- cures d'antibiothérapie, pour éviter une surinfection bronchique.

A un stade évolué de la maladie (entre 20 et 30 ans), la seule solution possible est la greffe d'un bloc cœur-poumon. La difficulté de cette décision étant de bien choisir le moment (ni trop tôt, ni trop tard) et de trouver un donneur compatible.

VI/ THERAPIE GENIQUE TRANSFERT DE GÈNE

La thérapie génique est basée sur l'apport d'un gène normal. Elle est donc adaptée à des mutations « perte de fonction ».

La difficulté de cette technique est qu'il faut se débrouiller pour que le gène soit exprimé au moment et à l'endroit voulus et en quantité suffisante.

On introduit un gène normal dans les cellules somatiques du patient pour corriger les effets délétères du gène muté. Il s'agit donc d'une thérapie somatique par transfert de gène dans les cellules somatiques.

1/ Nature et conséquences des mutations (rappel) :

Mutation perte de fonction : mutation conduisant à une absence ou une absence d'activité de la protéine.

Ex : délétion emportant le gène.

Ces mutations peuvent exister à l'état autosomique récessif ou autosomique dominant (conduisant dans ce cas à une haploinsuffisance) ou lié à l'X.

Ex : Myopathie de Duchenne : absence de dystrophine.

Enzymopathies récessives : maladies métaboliques liées à l'absence ou l'inactivité de l'enzyme.

Mutation gain de fonction : augmentation de l'activité normale d'une protéine (ex : un récepteur) ou acquisition d'une fonction nouvelle qui peut être toxique pour la cellule.

Ex : Maladies de triplets, du type de la polyglutaminie : Chorée de Huntington (répétition de CAG)

2/ Transfert de gènes (multiples questions) :

- Concept simple mais difficultés majeurs en pratique +++.
- Comment délivrer, aux patients qui en ont besoin, le gène d'intérêt ?
- Comment assurer une bonne régulation de l'expression de ce gène ?
- Comment assurer la production en quantité suffisante du produit du gène ?
- Comment maintenir l'expression sur un temps long ?
- Comment réaliser cela en toute sécurité pour le patient ?

3/ Les vecteurs :

Il existe plusieurs types de vecteurs : viraux et non viraux.

Parmi les vecteurs viraux, on a les rétro et lenti virus (ex : HIV est un lentivirus), les adénovirus, les AAV.

Il existe des avantages et des inconvénients : expression à court ou long terme/ intégration ou pas dans le génome/ immunogénicité (on ne peut pas réadministrer le virus, qui sera alors

éliminé tout de suite ⇒ court terme)

Le gène (le plus souvent ADNc) est contenu dans une cassette d'expression contenant un promoteur et un signal de polyadénylation.

L'administration peut se faire de plusieurs manières ; on verra les approches ex vivo et in vivo.

Avantages (✓) et inconvénients (✗) des vecteurs :

Non viraux :

- ✓ Plasmides associés à des liposomes
- ✗ Expression transitoire
- ✗ Très peu efficaces

Rétrovirus :

- ✓ utilisés ex vivo.
- ✓ Insertion dans le génome avec expression permanente
- ✗ Nécessité de cellule en cycle pour intégrer le génome.
- ✗ Risque de mutagenèse insertionnelle (ex : SCID) : s'insèrent parfois dans des régions où ils entraînent des mutations très délétères.

Lentivirus (famille des rétrovirus) :

- ✓ Peuvent s'insérer dans des cellules qui ne sont pas en cycle.

Adénovirus :

- ✓ Très haut niveau d'expression
- Pas d'intégration dans le génome, donc : ✓ pas de risque de mutagenèse insertionnelle
- ✗ expression transitoire +++
- ✗ Réponse immune lors de réadministration +++.

AAV (Adeno Associated Virus) :

- ✓ Persistance plus grande
- ✓ Moins de problème avec la réponse immune (moins immunogène)
- ✗ Petite taille : on n'arrive pas à y mettre de grands gènes (ex : gène de la dystrophine est trop grand et ne rentre pas dans un AAV)

4/ Les approches ex vivo et in vivo :

Approche ex vivo :

- greffe de cellules génétiquement modifiées in vitro
- prélèvement chez le malade de cellules
- transduction par l'agent viral de ces cellules ex vivo au laboratoire (on infecte avec le vecteur viral qui contient le gène d'intérêt)
- réadministration de ces cellules transduites au patient.

Approche in vivo :

Administration par voie intraveineuse ou intramusculaire du vecteur avec le gène d'intérêt chez le patient.

5/ Exemples de déficits immunitaires combinés sévères (SCID) :

Ces déficits sont nombreux.

Déficit en adénosine désaminase :

Maladie autosomique récessive.

Il y a un déficit enzymatique conduisant à l'accumulation dans les lymphocytes d'un métabolite toxique pour les lymphocytes.

Décès vers l'âge de 2 ans.

La greffe de moelle osseuse est efficace mais nécessite un donneur compatible et la mortalité reste élevée.

On fait donc un transfert à l'aide d'un rétrovirus dans les lymphocytes (il s'agit de la première application de la thérapie génique chez l'homme). Bonne efficacité chez certains receveurs.

SCID lié à l'X :

Maladie due à un déficit de la chaîne gamma des récepteurs aux interleukines.

La greffe de moelle osseuse est efficace mais nécessite un donneur compatible et la mortalité reste élevée.

On fait un transfert par rétrovirus dans la moelle osseuse. L'efficacité est démontrée sur une durée de plusieurs années. Mais on a remarqué l'apparition, après plusieurs mois, chez certains receveurs, d'une leucémie liée à un phénomène de mutagenèse d'insertion !

6/ Bilan et Leçons :

- Succès obtenus dans les déficits immunitaires.
- Situations favorables : situations impliquant une thérapie génique locale : maladies oculaires, génodermatoses .
- Dans la majorité des cas, l'efficacité est très limitée du fait de multiples facteurs incluant l'insuffisance de production de la protéine et la réponse immune contre les vecteurs viraux.

VII/ THERAPIES CIBLEES DERIVEES DE LA CONNAISSANCE DES GENES

Stratégies très variées :

- Connaissance des gènes en cause, de la nature des mutations et des mécanismes physiopathologiques (cibles secondaires possibles).
- La majorité des approches est encore au stade pré-clinique uniquement.
- Action directe sur le génôme, in vitro ou ex vivo.
- Actions ciblées sur les transcrits ARN.
- Actions ciblées sur les protéines.
- Importance des études pré-cliniques et des modèles animaux +++.

1/ Actions ciblées sur les transcrits ARN – Approche visant à dégrader

l'ARN muté :

Oligonucléotides antisens: dégradation des ARN mutés par administration d'un oligonucléotide antisens (monobrin d'ADN) spécifique du gène muté. Technique certes séduisante, mais il existe encore des problèmes de stabilité, de spécificité et d'efficacité de ces oligonucléotides.

ARN interférence: dégradation des ARN mutés par administration d'un ARN double brin de petite taille spécifique du gène muté. On retrouve les mêmes difficultés qu'avec les oligonucléotides antisens et le déclenchement possible d'une expression des gènes de l'interféron par ces ARN double brins.

Des essais pré-cliniques ont été faits chez des souris, mais pas chez l'homme.

Ribozymes: molécule d'ARN ayant une activité enzymatique, qui reconnaît spécifiquement un région d'un ARN et catalyse un clivage d'une liaison phosphodiester à l'intérieur de la molécule cible.

Ces ribozymes pourraient être utilisés pour détruire les ARN codés par l'allèle muté dans une maladie dominante.

Mais il existe des problèmes de stabilité, d'efficacité, et des difficultés pour obtenir une concentration suffisante à l'intérieur de la cellule.

2/ Stratégies basées sur la modification des ARN – modification de l'épissage d'un ARN ou de sa traduction :

♦ Approches visant à éliminer un exon porteur d'une mutation STOP : « saut d'exon », à l'aide d'oligonucléotides antisens.

Ex : dystrophine (dans la myopathie de Duchenne)

♦ Approches visant au contraire à rétablir un épissage aboli par une mutation ou à favoriser la synthèse de transcrits contenant un exon d'intérêt.

Ex : amyotrophine spinale infantile avec le gène SMN2.

♦ Approches visant à changer la traduction d'un messenger muté.

Ex : utilisation de composés permettant de changer la lecture d'un ARN porteur d'une mutation non sens.

Ces méthodes sont en cours d'exploration dans des modèles in vitro et des modèles animaux.

3/ Actions ciblées sur la/les protéine(s) – thérapies substitutives : apport de la protéine manquante :

Ces approches sont particulièrement bien adaptées aux maladies héréditaires dans lesquelles la protéine manquante est extra-cellulaire. Elles nécessitent cependant de répéter l'administration.

Ex : Déficit en hormone de croissance.

Hémophilie

Maladie de Gaucher

Pour la maladie de Gaucher: traitement par glucocérébrosidase recombinante (cerenzyme par

voie IV), tous les 15 jours.

Traitement très efficace pour le type 1 (forme la plus fréquente) mais inefficace dans le type 2 (avec atteinte neurologique) car l'enzyme ne passe pas la barrière hémato-encéphalique.

Le coût de ce traitement est très élevé.

Il est possible d'avoir recours à un traitement complémentaire par inhibiteur métabolique (miglustat).

VIII/ RECHERCHES ET PERSPECTIVES THERAPIE CELLULAIRES

1/ Cellules souches :

Cellules souches adultes : cellules contenues dans un organe donné qui sont capables de :

- 1) s'autorenouveler
- 2) se différencier en différentes cellules composant un organe.

Cellules souches embryonnaires : cellules contenues dans une partie interne du blastocyste embryonnaire qui sont capables de :

- 1) s'autorenouveler
- 2) se différencier en multiples types cellulaires.

Mais il existe des conditions strictes sur le plan légal d'utilisation +++.

2/ Cellules souches et thérapeutique des maladies génétiques : Ex : Chorée de Huntington :

On va greffer des cellules souches neurales fœtales (greffes allogéniques).

On a greffé 6 patients et on les a suivis pendant 6 ans.

On a remarqué une amélioration pendant 2 ans chez 3 patients (alors que la maladie de Huntington va normalement toujours en se dégradant). De plus, chez les 3 non améliorés, on n'a pas remarqué d'aggravation.

Cependant, chez les patients initialement améliorés, la poursuite secondaire a mené à une aggravation de la maladie.

Ceci traduit la difficulté d'approvisionnement en cellules souches fœtales.

Il ya aussi des problèmes liés au caractère allogénique de la greffe.

Ainsi, si on pouvait disposer de cellules souches autologues (donc des patients) dont le défaut génétique a été corrigé... ce serait merveilleux !

C'est sur quoi travaillent recherches actuelles, mais il existe des difficultés techniques et là encore un encadrement légal strict.

CONCLUSION

Il ne faut pas négliger les thérapies symptomatiques et le confort du patient+++.

Les essais cliniques de la thérapie génique ont montré que le transfert de gènes était possible chez l'homme, et qu'il était possible d'obtenir une expression d'un gène introduit et une amélioration phénotypique. Mais les défis sont maintenant de trouver les moyens d'obtenir un niveau et une durée d'expression permettant une correction durable.

Il existe de multiples approches de thérapies ciblées dérivées de la connaissance des

gènes et des mécanismes physiopathologiques en cours d'exploration mais qui ne sont pas encore opérationnelles en clinique.

La poursuite des recherches est donc indispensable. Des espoirs sont fondés sur la pharmacogénomique (trouver une molécule sans passer par une thérapie génique).