



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2012

FACULTE DE PHARMACIE

**PERSPECTIVES DES THERAPIES GENIQUES EN
2012 : UNE ANALYSE AU TRAVERS DES
BIOTECHNOLOGIES EMPLOYEES, DE LA
MALADIE D'ALZHEIMER ET DU CANCER
BRONCHIQUE A NON PETITES CELLULES**

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 février 2012

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par **Stéphane LAFONTAINE**

Né le 14 juillet 1987 à Metz (57)

Membres du Jury

Président : Pr Bertrand RIHN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Directeur : Dr. Joël COULON, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : Dr. Isabelle BERTRAND, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Pr. Jean-Louis MERLIN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de NANCY

Dr. Thomas MENARD, Pharmacien en officine

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2012

FACULTE DE PHARMACIE

**PERSPECTIVES DES THERAPIES GENIQUES EN
2012 : UNE ANALYSE AU TRAVERS DES
BIOTECHNOLOGIES EMPLOYEES, DE LA
MALADIE D'ALZHEIMER ET DU CANCER
BRONCHIQUE A NON PETITES CELLULES**

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 février 2012

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par **Stéphane LAFONTAINE**
Né le 14 juillet 1987 à Metz (57)

Membres du Jury

Président : Pr Bertrand RIHN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Directeur : Dr. Joël COULON, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : Dr. Isabelle BERTRAND, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Pr. Jean-Louis MERLIN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de NANCY

Dr. Thomas MENARD, Pharmacien en officine

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Responsable de la filière Officine :

Responsables de la filière Industrie :

Responsable du Collège d'Enseignement

Pharmaceutique Hospitalier :

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Francine KEDZIEREWICZ

Francine PAULUS

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Jean-Michel SIMON

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ♀	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN ♀	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique

Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV ☞	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ☞	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
PROFESSEUR AGREGÉ		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

☞ En attente de nomination

**Discipline du Conseil National des Universités :*

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

In memoriam

Marcel et Denise LAFONTAINE

*Pour vous deux, que la maladie a frappé,
Pour vous deux, qui vous êtes battus contre,
Pour vous deux, sans qui je ne serais pas là,
Pour vous deux, qui furent condamnés à oublier...*

*Personne n'est éternel, mais il n'est rien de pire que d'oublier les visages que
l'on aime et rien de pire que d'errer sans but. A vous deux, je dédie ce travail.
Puisse la recherche vaincre un jour cette terrible maladie.*

A mon jury

A M. le Dr Joël COULON, merci pour tout. Merci tout d'abord pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse, merci pour votre enseignement à la faculté, pour votre disponibilité, pour votre simplicité et merci pour votre soutien comme enseignant référent au tutorat lors des mes années en tant que tuteur et en tant que responsable de celui-ci.

A M. le Professeur Bertrand RIHN, merci pour vos cours qui furent stimulants et très intéressants, ils m'ont en parti donné l'envie de traiter ce sujet. Merci également pour votre disponibilité au tutorat. Merci aussi pour votre présence en tant que président de ce jury.

A Mme le Dr Isabelle BERTRAND, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'apporter vos compétences pour juger ce travail.

A M. le Professeur Jean-Louis MERLIN, merci pour vos cours à la faculté et pour avoir rendu un domaine vaste et complexe comme l'oncologie fort plaisant à apprendre et allant à l'essentiel pour un Pharmacien. Merci également de m'avoir guidé pour une partie de cet ouvrage et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

A M. le Dr Thomas MESNARD, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'apporter vos compétences en tant que Pharmacien d'officine.

A ma famille et à mes amis

Merci d'avoir été là dans les bons moments comme dans les mauvais. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et je sais que je pourrai toujours compter sur vous tous.

« Nul ne sait, en outre, en quelle condition et par quels moyens l'Âme meut le Corps, ni combien de degrés de mouvement elle peut lui imprimer et avec quelle vitesse elle peut le mouvoir. D'où il suit que les hommes quand ils disent que telle ou telle action du Corps vient de l'Âme, qui a un empire sur le Corps ne savent pas ce qu'ils disent et ne font rien d'autre qu'avouer en langage spécieux leur ignorance de la vraie cause d'une action qui n'excite pas en eux d'étonnement. »

SPINOZA, *Ethique*, Livre III, proposition 3, scholie

« Audaces fortuna juvat. »

Virgile, *Énéide*, livre X, v. 284.

« Carpe diem. »

Horace, *Ode*, I, 11

Table des matières

Liste des abréviations	4
INTRODUCTION	6
CHAPITRE 1 – GENERALITES	10
1. Définitions	10
1.1. Les thérapies géniques	10
1.1.1. Définition du terme « thérapie génique »	10
1.1.2. Les thérapies géniques somatiques	11
1.1.3. Les thérapies géniques germinales	12
1.2. Une nécessité : l'étude du génome, définition, déroulement et apports.....	12
1.3. Les biotechnologies	13
2. Historique des biotechnologies, des thérapies géniques et leur avènement	15
2.1. Historique des biotechnologies.....	15
2.1.1. Les proto-biotechnologies.....	15
2.1.2. La période intermédiaire.....	16
2.1.3. Les Biotechnologies modernes.....	17
2.2. Historique des thérapies géniques.....	19
3. Principe et utilisation des biotechnologies dans les thérapies géniques.....	22
3.1. Principe.....	22
3.1.1. La théorie.....	22
3.1.2. La réalisation	22
3.1.3. Différents types de procédés d'introduction d'un gène	23
3.2. Les biotechnologies utilisées en thérapie génique : les vecteurs de transfert de gènes.....	24
3.2.1. Les différents types de vecteurs.....	24
3.2.2. Structure d'un vecteur viral et conception d'une particule virale recombinante.....	26
3.2.3. Caractéristiques des différents vecteurs viraux	30

3.2.4. Effets indésirables	31
4. Espoirs portés par les thérapies géniques.....	35
4.1. Origine des espoirs	35
4.2. L'éthique : peut-on procéder à des thérapies géniques ?.....	35
4.3. Les résultats doivent-ils encourager l'espoir ?	36
CHAPITRE 2 – LA MALADIE D'ALZHEIMER	39
1. Présentation et épidémiologie.....	39
1.1. Définition	39
1.2. Un peu d'Histoire.....	40
1.3. Epidémiologie : quelques chiffres	41
2. Physiopathologie	42
2.1. Les formes familiales	42
2.1.1. La théorie admise par la communauté scientifique	42
2.1.2. Récentes découvertes	48
2.2. Les formes sporadiques.....	49
2.2.1. Les facteurs de risques génétiques	49
2.2.2. Les facteurs de risques autres	50
2.3. Potentielle remise en cause de l'amyloïdogenèse comme facteur déclenchant de la maladie ?	51
2.4. Evolution corticale.....	52
2.4.1. Topographie des lésions et ordre d'apparition	53
2.4.2. Conséquences cliniques	54
3. La stratégie d'attaque en thérapie génique et les techniques utilisées	56
3.1. Rappels	56
3.2. Les études en cours	56
3.2.1. Que sont donc les neurotrophines ?	57
3.2.2. Le NGF : cible de la thérapie génique contre l'ALZHEIMER.....	58
3.2.3. 1 ^{ER} essai clinique	58
3.2.4. Deuxième essai clinique	61
3.2.5. Autres expériences en cours	64
3.3. Le NGF : présence d'un danger potentiel existant ?	65

4. Conclusions sur les possibilités et perspectives	66
CHAPITRE 3 – LE CANCER BRONCHIQUE A NON PETITES CELLULES (CBNPC)	67
1. Présentation et épidémiologie.....	68
1.1. Définition	68
1.2. Epidémiologie.....	69
1.3. Classification TNM	71
2. Physiopathologie	75
2.1. Généralités	75
2.1.1. Anatomie	75
2.1.2. Physiologie.....	77
2.2. Etiologies et conséquences cliniques	77
2.2.1. Etiologies et facteurs de risques.....	77
2.2.2. Les gènes incriminés.....	79
2.2.3. Symptomatologie	80
3. La stratégie d’attaque en thérapie génique et les techniques utilisées	82
3.1. Le gène p53 : cible de la thérapie génique contre le CBNPC	82
3.2. Etude menée par le NCI (National Cancer Institute)	82
4. Conclusions sur les possibilités et perspectives	86
CONCLUSION	88
LISTE DES FIGURES	91
LISTE DES TABLEAUX	93
BIBLIOGRAPHIE	94

Liste des abréviations

- AAV : Adeno-Associated Virus
- ADA - SCID : Adenosine Deaminase - Severe Combined Immune Deficiency (syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié à l'adénosine désaminase)
- ADAS : Alzheimer Disease Assessment Scale
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- Apo : Apolipoprotéine
- APP : Amyloid Precursor Protein
- ARN : Acide Ribonucléique
- CBNPC : Cancer Bronchique à Non Petites Cellules
- CBPN : Calcium Binding Protein Neurons
- CLU : Clusterine
- CR 1 : Complement Receptor 1
- DNF : Dégénérescence Neurofibrillaire
- Env : Ensemble de gènes donnant les protéines de l'enveloppe d'un virus
- Gag : Ensemble de gènes donnant les protéines de la capside d'un virus
- GWAS : Genome-Wide Association Studies

- LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
- LRP-1 : LDL Receptor-related Protein 1
- MA : Maladie d'ALZHEIMER
- MAP : Microtubule Associated Protein
- MMSE : Mini-Mental Status Examination
- NGF : Nerve Growth factor
- NT-3 et NT-4 : Neurotrophine 3 et 4
- OGM : Organisme Génétiquement Modifié
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- pH : Potentiel d'Hydrogène
- Pol : Polymérase permettant la transcription inverse d'un génome viral
- PS1 et PS2 : Préséniline 1 et 2
- Psi : Site d'encapsidation
- RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts
- SCID - X : Severe Combined Immune Deficiency linked to chromosome X
(syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié au chromosome X)
- Sp : Site Promoteur
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- Vp : Viral Particles (particules virales)

INTRODUCTION

Les thérapies géniques constituent, à l'heure actuelle, l'un des enjeux majeurs de ce siècle. Si les biotechnologies prennent déjà une place importante aujourd'hui (immunothérapies, vaccins recombinants, hormones de croissances, etc...), on espère d'elles aussi qu'elles permettront de développer ces nouvelles thérapies qui semblent apporter des réponses pour toutes sortes de maladies et qui restent pour l'heure expérimentales. Les thérapies géniques semblent intéressantes notamment pour soigner des maladies orphelines qui sont des maladies génétiques (Progéria, fibrodysplasie ossifiante progressive, maladies des os de verres, syndrome de Lowe, ...) mais aussi des maladies auto-immunes, des déficits immunitaires (syndrome de Wiskott Aldrich), la mucoviscidose, des cancers comme le cancer bronchique à non petites cellules (CBNPC) que l'on se propose de traiter ici, et des maladies neurodégénératives avec des phénomènes de sociétés comme ce qui va nous intéresser également dans cette thèse : la maladie d'ALZHEIMER (MA).

Les objectifs des thérapies géniques sont donc multiples. En effet, en s'attaquant à l'essence même d'un problème, on le résout efficacement. Ici donc, l'essence même de toutes pathologies considérées, c'est la présence de gènes anormaux qui les déclenchent ou les favorisent, ou encore l'absence d'un gène. Si l'on parvient à corriger une anomalie, ou à apporter un gène bénéfique, on peut alors à priori espérer supprimer cette maladie. C'est ce que l'on va s'attacher à évaluer au travers de ce travail. Peut-on espérer beaucoup de ce nouveau type de thérapie ? Quels sont les moyens techniques à l'heure actuelle pour tenter d'y parvenir ? Quels sont les bénéfices, les problèmes rencontrés ? Effectivement, en modifiant le génome, on change le patrimoine génétique d'un individu, ce n'est pas anodin... Et les méthodes utilisées ont leurs inconvénients également.

Nous le verrons par la suite au travers de deux exemples : la maladie d'Alzheimer et le cancer bronchique à non petites cellules (CBNPC).

Le principe d'une thérapie génique est simple. Il suffit tout d'abord de connaître le gène incriminé dans une maladie à composante génétique, puis par divers moyens biotechnologiques (vectorologie) que nous aborderons plus loin, de le remplacer. Pour cela il faudra parvenir à le faire pénétrer dans les cellules de l'individu jusqu'au noyau, puis remplacer le gène déficient en insérant le nouveau (fonctionnel) que l'on aura isolé **(1)**.

Il faut différencier deux types de thérapies géniques :

- Les thérapies géniques somatiques qui touchent à toutes les cellules somatiques donc non sexuelles.
- Les thérapies géniques germinales qui consistent à modifier le génome des gamètes mâles ou femelles ou d'un embryon, ce qui pose quelques problèmes d'éthiques étant donné que l'on modifie le patrimoine génétique du futur individu sans qu'il puisse avoir quelques mots que ce soit à dire **(1)**.

Si l'on y réfléchit bien, le terme de thérapie génique qui paraît révolutionnaire et récent, est en réalité plus ancien qu'on ne l'imagine. En effet, après la découverte de la double hélice d'ADN par WATSON et CRICK en 1953 et la compréhension du fonctionnement des enzymes de restriction en 1970, on envisage alors ce qui auparavant aurait pu relever du domaine de la science-fiction, l'Homme peut modifier la composition du génome **(2)**.

Cela présuppose toutefois de connaître ce même génome ce qui représente un travail colossal chez l'Homme (3.2 milliards de paires de bases et plus de 40 000 gènes estimés **(figure 1)**).

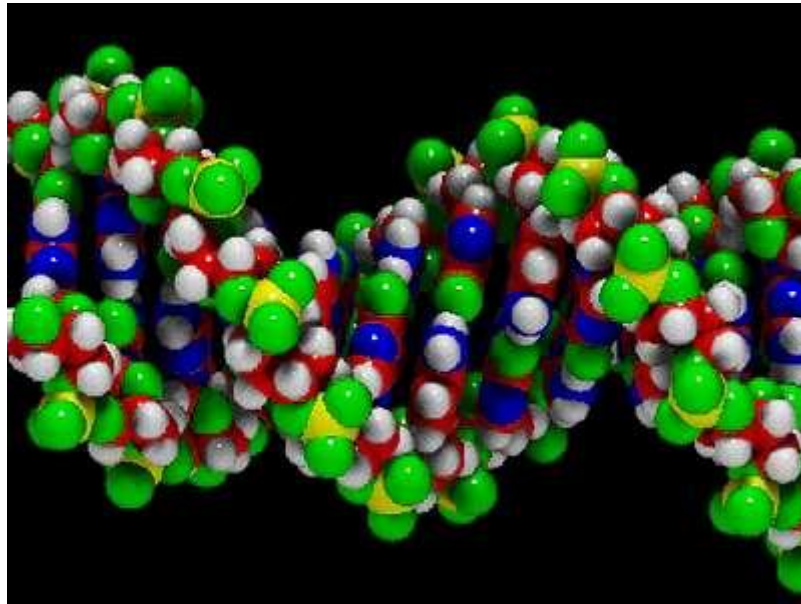


Figure 1 : Un gène est un fragment d'ADN (3)

Ainsi donc, lorsque l'on connaît le génome, on peut le modifier mais ceci n'est pas forcément sans conséquence car l'utilisation de biotechnologies est nécessaire et celle-ci n'est pas sans risque... On utilise principalement des vecteurs viraux (recombinaisons possibles avec d'autres virus, développement d'encéphalites,...), mais aussi d'autres types qui ne laissent pas nécessairement sans effets indésirables et qui peuvent être très graves. De plus, rien ne garantit que le nouveau gène instauré ne réagisse pas mal au sein de l'organisme, rien n'assure qu'il s'exprimera ou qu'il s'insérera correctement.

Les connaissances actuelles en génétiques qui paraissent déjà grandes sont en réalité partielles. La nature parcellaire de ces connaissances oblige à la prudence.

Aujourd'hui, il existe des thérapies géniques mises à l'étude dans les cas de la maladie d'ALZHEIMER et du CBNPC. Ces études ont commencé au début des années 2000 et viennent de prendre fin.

L'objectif est donc d'exposer dans une première partie les moyens techniques des thérapies géniques, les résultats que l'on a obtenu jusque-là, que peut-on en attendre ? Rêve brisé ou réel espoir ? On évaluera ensuite dans deux autres parties des études très récentes sur la thérapie génique dans la MA et le CBNPC qui deviennent un problème de société. Là aussi, les résultats suscitent-ils un réel espoir ou ne seraient-ils pas que des chimères ?

CHAPITRE 1 – GENERALITES

Avant toute chose, il faut ici aborder les définitions des concepts, le développement de la thérapie génique et des biotechnologies, leur histoire, les grands principes et les biotechnologies employées, les intérêts et utilisations afin de comprendre comment on en est arrivé jusque là. On ciblera ainsi mieux les enjeux et les apports dont l'on pourrait bénéficier grâce à ces thérapies, et notamment dans la maladie d'ALZHEIMER et le CBNPC.

1. Définitions

1.1. Les thérapies géniques

Il convient d'insister sur le déterminant « les ». En effet, il existe plusieurs types de thérapies géniques : les thérapies géniques somatiques et germinales. De plus, selon la maladie étudiée, on aura des différences en ce qui concerne les techniques utilisées et les finalités. Ainsi donc, on assiste bien à un pluralisme de ce genre de thérapie.

Cela dit, on pourrait parler de « la » thérapie génique dans un terme générique au sens où elles se rejoignent sur un grand principe de base : faire entrer un gène dans le patrimoine génétique d'une cellule **(1)**.

1.1.1. Définition du terme « thérapie génique »

La thérapie génique est une nouvelle approche de traitement ou de prévention des maladies qui utilise le gène comme médicament. En apportant un gène « normal », on permet ainsi à la machinerie cellulaire de

reproduire une protéine « thérapeutique » en quantité suffisante (**figure 2**). On utilise le terme de « normal » car il s'agit d'introduire le gène qu'aurait du avoir la personne pour fonctionner de manière saine et viable. Quant au terme de « thérapeutique », il est utilisé car on restaure bien une fonction physiologique (**4**).

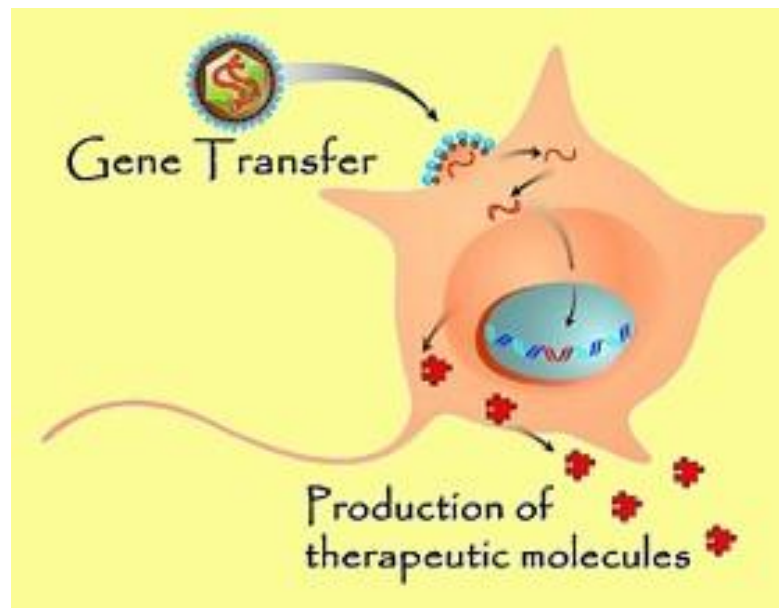


Figure 2 : Transfert d'un gène médicament (5)

C'est une science expérimentale pour le moment.

1.1.2. Les thérapies géniques somatiques

Ce sont les thérapies les plus courantes qui s'intéressent aux gènes des cellules dites somatiques, c'est-à-dire les cellules non reproductrices. Les deux cas que l'on se propose donc d'étudier au cours de notre travail sont de ce type. Celle-ci ne pose pas de problèmes éthiques dans la mesure où le patrimoine génétique ne sera pas transmis à la descendance et que l'individu concerné est d'accord pour prendre le traitement. D'ailleurs, vu le caractère expérimental de la chose, ce sont principalement des volontaires (**1**).

1.1.3. Les thérapies géniques germinales

Elles concernent les expériences sur des cellules reproductrices (spermatozoïdes et ovules) ou encore sur des embryons. Cette dernière est interdite par la loi. Effectivement, le génome sera transmis irrémédiablement à la descendance et cela pose des problèmes d'éthiques notamment par crainte de dérives Eugéniques. De plus, les incertitudes scientifiques concernant les conséquences sur les individus descendants qui viennent s'ajouter, ces thérapies semblent condamnées à ne jamais être développées **(1) (6)**.

1.2. Une nécessité : l'étude du génome, définition, déroulement et apports

Le génome constitue l'ensemble des gènes dans une espèce donnée, en l'occurrence ici chez l'Homme.

Si l'on a vu dans le principe qu'il faut remplacer un gène anormal (ou absent), il faut encore savoir lequel remplacer et avoir à disposition le gène fonctionnel à insérer. Cela passe par une connaissance du génome de l'Etre Humain.

A l'heure actuelle, on sait que l'ADN regroupe 3.2 milliards de paires de bases. Il contiendrait près de 40 000 gènes. La connaissance du génome « normal » a été permise par des méthodes de séquençages diverses mais la technique actuelle de référence est la méthode de Sanger basée sur l'utilisation de didésoxynucléotides. Nous n'entrerons pas dans le détail de cette méthode car ce n'est pas le but de notre travail, toutefois, il est nécessaire de savoir que grâce à cette technique on connaît parfaitement la séquence de l'ADN Humain à ce jour. La connaissance du code génétique, la bio-informatique et les diverses avancées en biologie moléculaire ont permis de savoir quelle est la séquence exacte de l'ADN de l'Homme. Ceci est le résultat d'une coopération scientifique internationale bien entendu vu l'ampleur du travail **(7)**.

Si certes la connaissance du génome « normal » est une chose, il faut cependant également connaître le génome pathologique. Les généticiens ont donc pendant longtemps utilisé la technique traditionnelle qui consistait à s'intéresser à un gène simple en particulier, aux effets potentiels importants, puis recherchaient de grandes familles porteuses de maladies rares et graves (ex : mucoviscidose). Par les études dites de « linkage », ils ont pu établir des liens entre un phénotype anormal et le gène en question sur lequel ils observaient une mutation. Mais cette technique n'a permis l'identification d'allèles mutés que pour des maladies monogéniques. Ils se sont donc ensuite lancés sur la technique des gènes candidats en se basant sur des hypothèses physiopathologiques. Par exemple, dans le diabète, on sait que le glucose n'est pas assimilé, on va donc soupçonner le gène codant pour l'insuline. Et il ne reste qu'à vérifier la présence d'une mutation sur ce gène.

Mais aujourd'hui, on réalise des génotypages à haut débit grâce à diverses méthodes de biologie moléculaire, on parle de Gwas (genome-wide association studies). L'intérêt de ces manœuvres est de retrouver les variants ou allèles (c'est-à-dire les versions d'un gène) susceptibles d'être incriminés dans une maladie donnée **(7)**.

Une des mesures du plan contre la Maladie d'Alzheimer (que l'on peut retrouver sur le site de la Fondation Alzheimer) consiste à réaliser un génotypage à haut débit sur près de 20 000 personnes. Les études ont été principalement réalisées en France et ont permis de découvrir de nouveaux variants que l'on soupçonne d'être impliqués dans cette maladie : CLU et CR1 dont nous reparlerons plus loin **(8)**.

1.3. Les biotechnologies

Si l'on décompose le mot, on relève deux « racines ». Tout d'abord, « bio », puis « technologie ».

En réalité, c'est la contraction de deux mots :

- « bio » pour biologie, c'est-à-dire l'étude du vivant.
- « technologie », c'est-à-dire l'étude d'une technique.

Les biotechnologies réunissent donc deux sciences : celle du vivant, et celle de l'ingénierie. La finalité d'une biotechnologie est tout simplement de donner naissance à des êtres vivants modifiés ou non (plantes, champignons, bactéries,...) afin de produire un bien, des molécules d'intérêts (protéines, enzymes, hormones,...) ou des vecteurs (par exemple pour les thérapies géniques dont nous verrons plus tard le déroulement de la conception) **(9)**.

2. Historique des biotechnologies, des thérapies géniques et leur avènement

2.1. Historique des biotechnologies

Le terme de biotechnologie apparaît pour la première fois en 1913. Evoqué par EREKY, il désignait ainsi l'utilisation de la matière vivante pour la production de biens et de services. Pourtant, si ce terme est apparu au début du XXème siècle, la pratique est extrêmement ancienne, depuis que l'Homme a commencé à fabriquer du fromage, du pain, et des boissons alcoolisées, c'est-à-dire depuis l'Antiquité. Sans le savoir, il procédait déjà à l'utilisation de biotechnologies puisque ces produits résultent de la fermentation par des micro-organismes, mais l'utilisation qui en était faite était purement magique dans leur esprit et non scientifique **(10)**.

Nous allons donc voir la chronologie générale des événements jusqu'à nos jours.

2.1.1. Les proto-biotechnologies

Le terme désigne les biotechnologies qui furent développées depuis l'Antiquité jusqu'au XVIIIème siècle, c'est-à-dire l'utilisation de biotechnologies de manière empirique, sans aucune connaissance théorique **(10)**.

- **Antiquité** : fabrication de pain, de bière, de fromage et de vin.
- **Moyen Age** : distillation de l'alcool issu de la fermentation en Occident.
- **XVIème siècle** : formations de corporations d'artisans spécialisés dans la fabrication de la bière.

- **XVII^{ème} siècle** : culture des champignons de couche en France (= champignon de Paris « *Agaricus bisporus* ») grâce à des déchets organiques (fumier).
- **XVIII^{ème} siècle** : développement de la chimie, on connaît alors la fermentation alcoolique et on réalise industriellement la production de sucre grâce à la betterave.

2.1.2. La période intermédiaire

C'est le développement des connaissances théoriques **(10)**.

- **XIX^{ème} siècle** :

On développe des lignées pures de céréales, on voit apparaître les études qualitatives et quantitatives de GAY-LUSSAC en complément des travaux de LAVOISIER sur la fermentation alcoolique, on découvre la nature biologique des fermentations grâce à CAGNIARD-LATOUR (France) et SCHWANN et KUTZING (Allemagne).

Il faut ajouter à cela les travaux de PASTEUR **(figure 3)** qui donnent naissance à la microbiologie. Il identifie également durant cette période les agents de la fermentation alcoolique et acétique, et remarque qu'en chauffant le vin à une certaine température, on empêche la fermentation acétique du vin qui du coup ne se transforme pas en vinaigre.



Figure 3 : Louis PASTEUR (11)

Grâce à ses découvertes, une nouvelle discipline a été développée : la microbiologie.

En 1887, PETRI donne son nom à une boîte contenant un milieu de culture pour les bactéries.

En 1894, le premier enzyme industriel est produit : la takadiastase (amylase extraite d'une levure).

En 1897, Büchner extrait la zymase des levures qui donnera suite à de nombreux travaux.

→ CE SONT DONC DES DECOUVERTES MAJEURES PERMETTANT LA MAITRISE DE L'UTILISATION DES BIOTECHNOLOGIES.

- **Début du XXème siècle :**

On évoque la notion d'enzymes (zymase) et de coenzymes, mais aussi de vitamines, de gènes, d'ADN. BANTING et BEST (Canada) découvrent l'insuline en 1921 et l'on parvient à peine quelques années après à la produire et à l'extraire.

En 1913, le terme de biotechnologie apparaît enfin.

2.1.3. Les Biotechnologies modernes

Aux alentours de la seconde Guerre Mondiale, on arrive dans la période d'applications des connaissances et on en accumule de toutes parts (en biologie cellulaire, moléculaire, et on invente de nombreuses techniques d'exploitations, ...). La production industrielle sous contrôle se développe et l'on arrive ainsi à notre époque au règne du « génie génétique » **(10)**.

- **XXème siècle :**

Découverte et production industrielle de la pénicilline pendant la seconde Guerre Mondiale (**figure 4**).

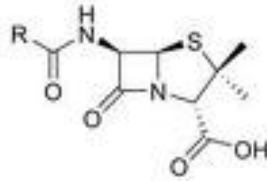


Figure 4 : Formule générale d'une pénicilline (12)

De 1972 à 1974, Paul BERG réalise la première molécule D'ADN recombinant.

En 1979, on parvient à produire l'insuline et l'hormone de croissance (GH) par des micro-organismes génétiquement modifiés, puis vient le tour de l'interféron en 1980.

En 1981 apparaît la première souris transgénique.

En 1983 apparaît la première plante transgénique (tabac) et on invente la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui permet de reproduire un grand nombre de fois une molécule d'ADN.

On arrive ainsi progressivement dans les années de développement des OGM (organismes génétiquement modifiés) et du clonage reproductif (brebis DOLLY en 1997).

- **De nos jours... :**

Le séquençage du génome Humain est terminé et on se trouve en plein essor du développement expérimental des thérapies géniques (**10**).

2.2. Historique des thérapies géniques

Les thérapies géniques à proprement parler sont récentes, elles arrivent grâce au développement du génie génétique. Mais si l'on en est arrivé jusqu'ici dans les années 2000, c'est parce que depuis le début du XXème siècle, les scientifiques ne cessent d'aller de découvertes en découvertes. Plusieurs découvertes majeures ont permis d'avancer et de développer ce domaine.

Tout commence avec Mendel (père fondateur de la génétique) en 1865 et la mise en évidence de l'hérédité grâce à des petits pois (« *Pisum sativum* ») **(10)**.

En 1909, le terme de gène est inventé par le danois Wilhelm JOHANNSEN, on distingue alors le génotype et le phénotype **(10)**.

En 1935, on parvient à obtenir de l'ADN pur **(10)**.

Arrive alors la découverte de la structure de la double hélice d'ADN établit par WATSON et CRICK dans laquelle les deux brins sont antiparallèles.

En 1970, l'usage précis des enzymes de restrictions est maîtrisé et on rêve alors de modifier la structure de l'ADN. Et c'est donc ainsi qu'en 1973, on réalise le premier transfert de gène sur une bactérie très commune : *Escherichia coli* **(2)**.

Mais c'est en 1980 que l'on assiste à une première tentative de thérapie génique sur l'Homme. Le Docteur CLINE, de l'Université de Californie à Los Angeles, tente ce premier essai pour soigner deux cas de thalassémie Béta-Zéro. Il s'agit d'une anémie d'origine génétique où la chaîne Béta de l'hémoglobine n'est pas synthétisée. Il émet l'hypothèse qu'en introduisant le gène fonctionnel codant pour la chaîne Béta, les problèmes seront alors résolus. Cependant, il réalisa cette expérience sans l'accord du comité d'éthique médicale et sans prévenir les patients... et son protocole qui ne semblait guère tenir compte de la protection de ces derniers, fut vivement critiqué, sans compter que l'expérience fut un échec. Il fut donc banni de la communauté scientifique et interdit d'expériences **(2) (13)**.

Ce premier échec stoppa momentanément la progression dans ce domaine et pendant longtemps on se posa de nombreuses questions sur l'éthique des thérapies géniques. N'est-ce pas jouer à Dieu ?

Cependant, en 1990, un premier succès arrive enfin dans le cas du traitement par thérapie génique d'un ADA-SCID qui est une maladie où le gène de l'ADA (enzyme) est déficitaire, ce qui provoque une immunodéficience **(10)**. Le nombre d'essais cliniques de thérapies géniques va alors augmenter considérablement **(figure 5)**.

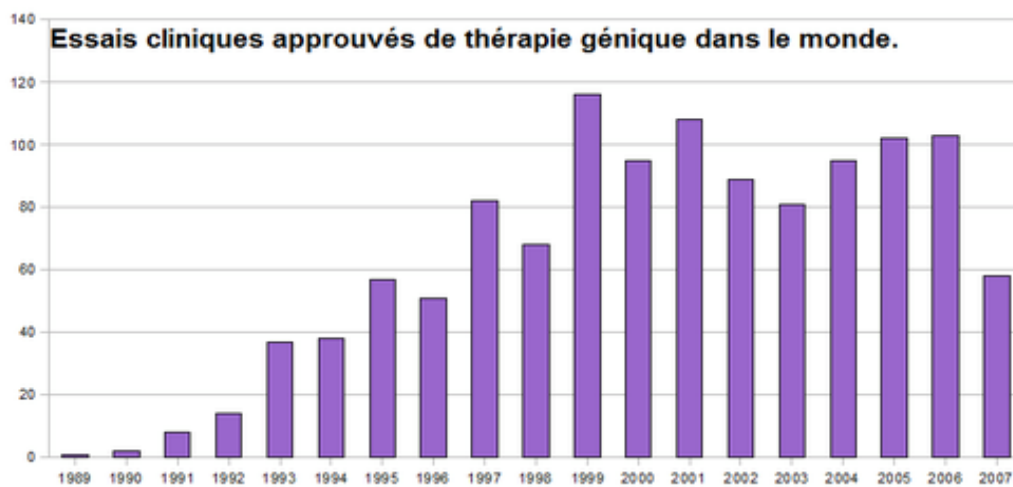


Figure 5 : Nombre d'essais cliniques approuvés en fonction des années **(14)**

En 2000, un autre type de déficience immunitaire, le SCID X, se voit traité par thérapie génique. L'opération est un succès mais deux ans plus tard, deux enfants bulles qui furent traités par ce type de thérapie à l'hôpital Necker-Enfants Malades de Paris, développèrent une leucémie. Ceci eut pour effet de stopper les recherches, mais un récent cas de succès réel en Grande Bretagne risque de relancer les travaux **(2)**.

Aujourd'hui, il existe une multitude d'essais en cours pour toutes sortes de maladies dont les alternatives thérapeutiques sont rares ou inexistantes (Parkinson, thalassémies, cancers, ...), avec une grosse majorité d'essais pour les cancers (**tableau 1**). Il semble que ce soit l'objectif thérapeutique des prochaines décennies...

Tableau 1 : Projets de thérapies géniques (environ 300) déposées en 2000 auprès des autorités américaines ou européennes (15)

Pathologies	Proportion
Cancer	72%
Maladies monogéniques	16%
Maladies infectieuses	8%
Maladies cardiovasculaires	2.6%
Arthrite rhumatoïde	0.6%
Autres	0.8%
Transfert IN VIVO	48%
Transfert EX VIVO	52%

3. Principe et utilisation des biotechnologies dans les thérapies géniques

3.1. Principe

3.1.1. La théorie

Comme vu précédemment dans la définition, il suffit d'isoler un gène d'intérêt qui soit fonctionnel et de l'introduire dans le génome des cellules d'un tissu donné pour suppléer à la fonction du gène muté responsable de la maladie ou du moins en partie responsable. Ainsi, une fois à l'intérieur du génome des cellules cibles, le gène sera transcrit en ARN messager, qui sera lui-même traduit pour donner une protéine thérapeutique qui modifiera le phénotype pathologique, on retrouvera alors un phénotype sain **(16)**.

3.1.2. La réalisation

- a) Diagnostic d'une maladie
- b) Connaissance de la physiopathologie
- c) Incrimination d'un ou plusieurs gènes mutés
- d) Identification d'un gène muté particulier (celui ayant un rôle majeur dans la maladie) que l'on souhaite remplacer afin de modifier le phénotype et de restaurer une fonction physiologique
- e) Isolement du gène fonctionnel correspondant
- f) Réalisation d'un vecteur contenant le gène fonctionnel que l'on souhaite introduire
- g) Mise en contact du vecteur avec les cellules cibles
- h) Si tout se déroule comme voulu, le gène fonctionnel fait alors partie intégrante du génome et le patient devrait guérir.

3.1.3. Différents types de procédés d'introduction d'un gène

- Le mode EX VIVO (**figure 6**) :

On extrait les cellules cibles du patient puis on les met en contact avec les vecteurs dans un milieu adapté en dehors donc de l'organisme. On réinjecte ensuite les cellules modifiées à l'intérieur de l'individu. Ceci représente la majorité des cas **(17)**.

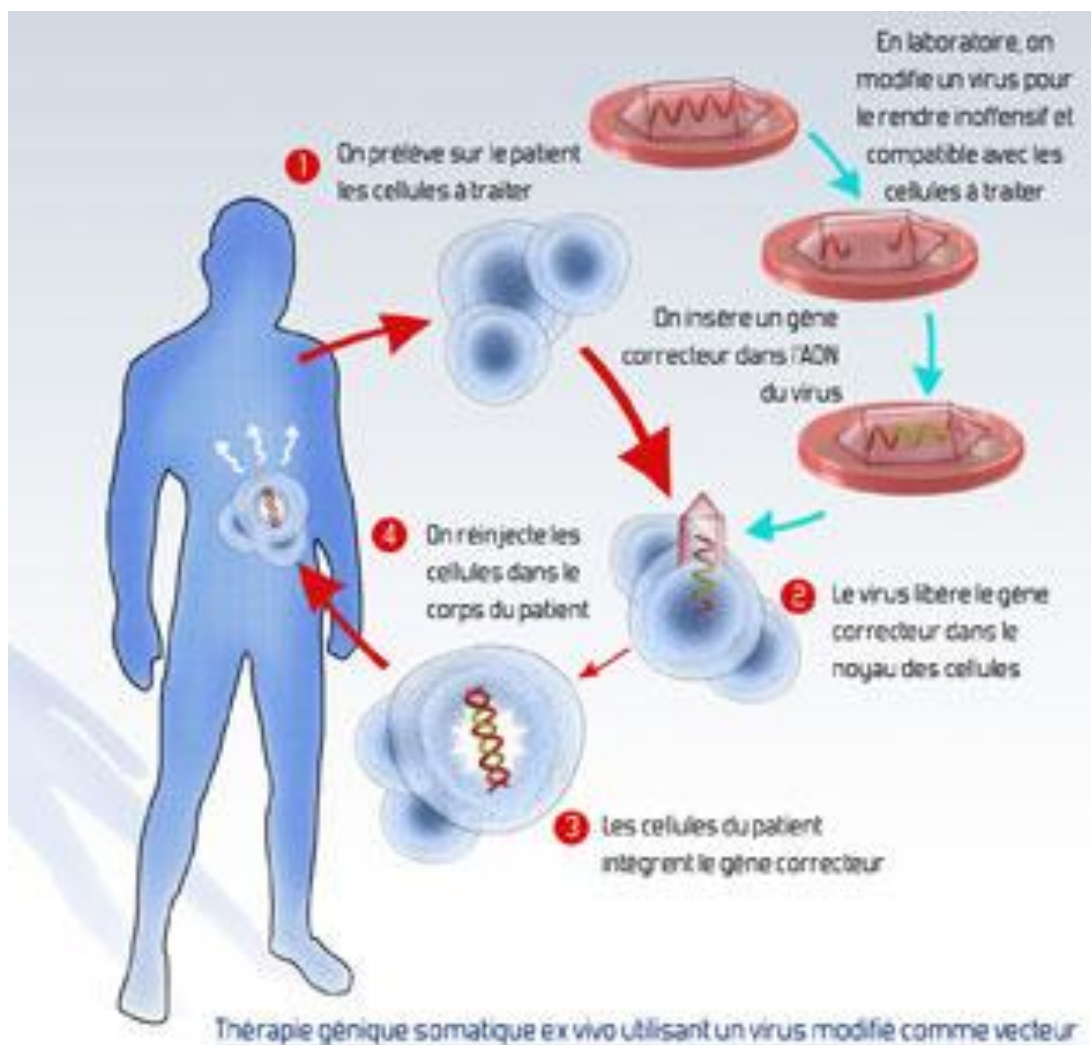


Figure 6 : Mode ex vivo (17)

- Le mode IN VIVO :

On injecte directement les vecteurs au sein de l'individu dans son sang mais ceci nécessite une parfaite connaissance et une parfaite maîtrise des vecteurs concernés. C'est la moins utilisée à l'heure actuelle **(17)**.

- Le mode IN SITU :

Le mode est dit IN SITU lorsque l'on injecte les vecteurs directement dans le tissu cible (exemple : trachée et bronches dans le cas de la Mucoviscidose) **(17)**.

3.2. Les biotechnologies utilisées en thérapie génique : les vecteurs de transfert de gènes

Un vecteur doit réunir plusieurs conditions pour pouvoir être utilisé. Tout d'abord, il doit être capable de contenir le transgène (gène thérapeutique que l'on cherche à introduire). Ensuite il doit pouvoir le protéger des agressions de l'environnement (enzymes, pH, ...). Enfin, il doit pouvoir pénétrer dans le plus grand nombre de cellules cibles possibles et leur transférer correctement et de manière durable le transgène (transmission aux cellules descendantes) sans altérer le génome. Les risques doivent être moindres par rapport au bénéfice attendu **(18)**.

3.2.1. Les différents types de vecteurs

- **Les vecteurs viraux** : ces derniers sont à l'heure actuelle les plus utilisés. En effet, le principal avantage de ces vecteurs réside dans leur

capacité à s'intégrer à l'intérieur d'une cellule. Les processus de pénétration naturels sont pour le moment les plus efficaces. Leur principal inconvénient réside dans le fait qu'on ne peut y insérer de trop grosses séquences d'ADN et que l'on a du mal à les produire en grande quantité. Qui plus est, leur production est coûteuse. On utilise majoritairement des virus recombinants défectifs **(16)**.

On se sert principalement de trois types de virus :

a) Les rétrovirus (virus à ARN, enveloppés **figure 7**)

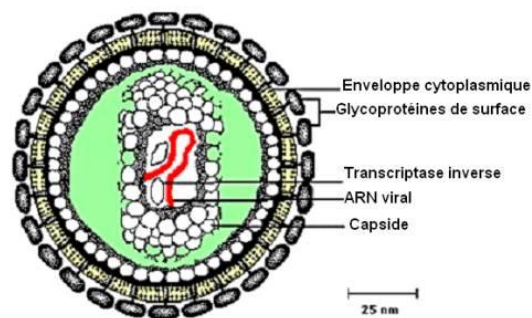


Figure 7 : Structure d'un rétrovirus (19)

b) Les adénovirus (virus à ADN, nus **figure 8**)

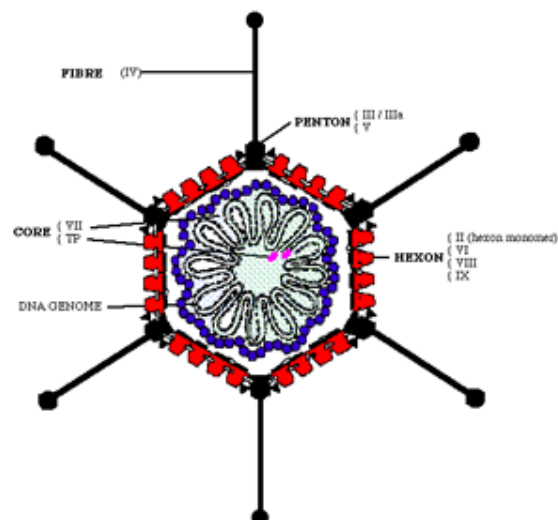


Figure 8 : Structure d'un adénovirus (20)

c) Les parvovirus (encore appelés les Adeno-Associated Virus ou AAV) (virus à ADN, nus).

- Les vecteurs non viraux : ce sont des molécules d'ADN complexées avec des macromolécules protéiques polycationiques ou lipidiques. Le couplage réalisé sert à cibler des récepteurs membranaires spécifiques (asialoglycoprotéines, transferrine,...) pour l'internalisation. Ceci permet de les adresser vers des types cellulaires particuliers. On utilise aussi des plasmides (morceaux d'ADN nus circulaires qui se répliquent de manière autonome). S'ils paraissent présenter plus d'avantages que les vecteurs viraux, leur utilisation est rare car l'efficacité est très limitée. On est capables de les fabriquer en grandes quantités à moindre coût, ils permettent de transporter de grosses séquences d'ADN, ils diminuent le risque de propagation de matériel génétique et provoquent moins de réactions inflammatoires. En dépit de tout cela les vecteurs non viraux pâtissent d'un manque d'efficacité par rapport aux vecteurs viraux **(16)**.

3.2.2. Structure d'un vecteur viral et conception d'une particule virale recombinante

- Structure :

On va utiliser dans la plupart des cas, un virus recombinant défectif, c'est-à-dire un virus (encore appelé provirus) auquel on a enlevé les séquences codant pour les protéines virales de l'enveloppe et de la capsid (séquences : gag(capsid) pol(polymérase permettant la transcription inverse du génome viral) env(enveloppe)) ou encore de facteurs de virulence. A la place de ces séquences, on y insère le transgène avec les séquences nécessaires à son expression.

On retrouve simplement comme génome viral de base les séquences permettant sa réplication (site promoteur sp), le signal d'encapsidation

(psi), les séquences permettant son incorporation dans le génome de la cellule cible et les LTR (Long terminal repeat) **(figure 9) (16) (21)**.

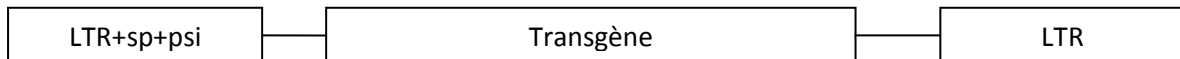


Figure 9 : Structure d'un vecteur viral

- Conception :

La conception est très complexe. En effet il ne suffit pas d'avoir d'un côté des virus et de l'autre le gène thérapeutique puis de les mettre ensemble. Le vecteur résultant doit de plus être inoffensif pour l'Homme.

Elle se déroule en plusieurs étapes faisant intervenir d'autres systèmes **(22) (23)**.

- a) Isolement de la séquence contenant le gène thérapeutique à partir de cellules en culture que l'on met dans un morceau d'ADN db circulaire procuré par des bactéries : le plasmide également appelé « cassette d'expression ». Il contient déjà le génome viral que l'on garde. L'isolement du gène se réalise grâce à des enzymes spécifiques appelées enzymes de restrictions (= endonucléases = méganucléases **figure 10**) et sa réinsertion dans le plasmide est permise grâce à des ligases. Ces enzymes agissent en des points précis et bien déterminés.

On sélectionne le gène d'intérêt dans une cellule en culture **(figure 10)**:

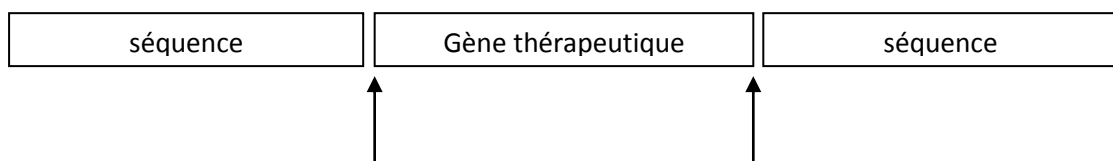


Figure 10 : Découpage par des endonucléases spécifiques

Dans un plasmide on découpe une séquence à remplacer comme pour le gène thérapeutique et on insert le transgène à la place (**figure 11**) :

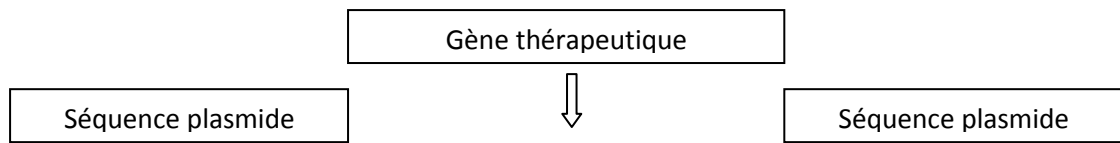


Figure 11 : Collage par une ligase spécifique

- b) Isolement de gènes viraux pour les incorporer dans d'autres plasmides (gènes codant pour les protéines de structures du virus (capside, enveloppe))
- c) Lyse des bactéries afin de récupérer les plasmides et sélection des plasmides transformés.
- d) Mise en contact des plasmides transformés avec des cellules dites d'« encapsidation » ou encore dites « transcomplémentantes ». Ces cellules vont se comporter comme des « usines », elles utiliseront leur machinerie cellulaire pour permettre la transcription des gènes puis leur traduction.

Les séquences contenant le transgène s'intégreront au sein d'une capsid (adénovirus et rétrovirus) et d'une capsid avec une enveloppe (pour ce qui est des rétrovirus).

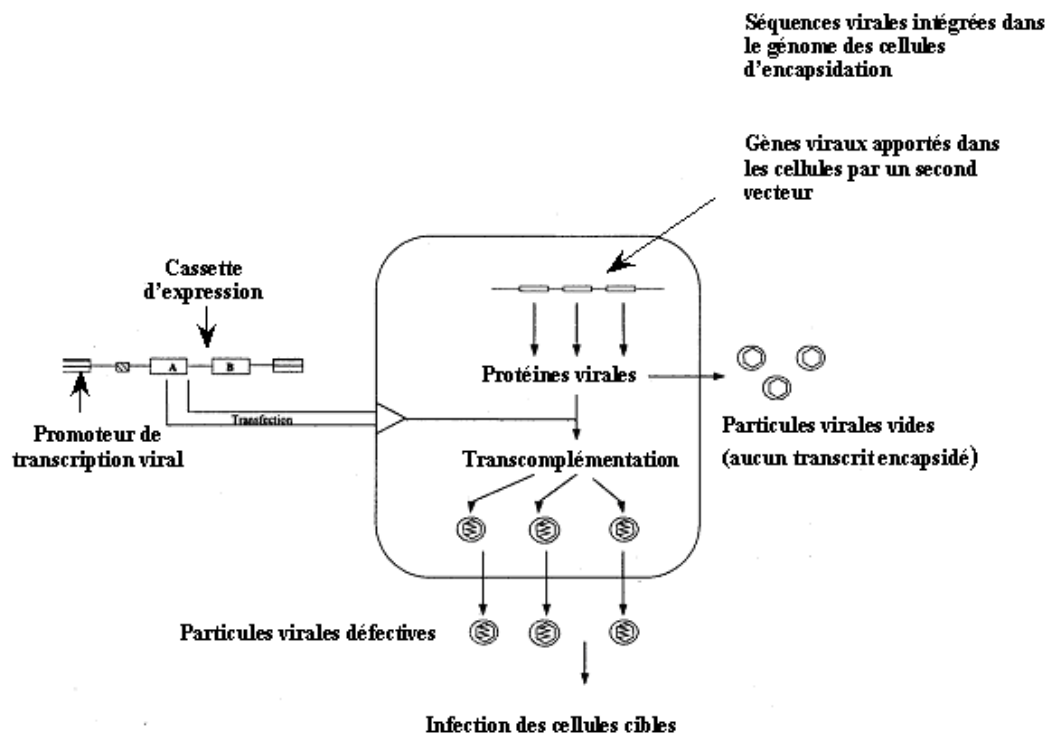


Figure 12 : Principe de production d'un vecteur viral (24)

- e) Pour effectuer la production des vecteurs viraux, il faut mettre dans un milieu spécifique les cellules transcomplémentantes et les plasmides (**figure 12**). On utilise pour cela des bioréacteurs.

Un bioréacteur a pour fonction de fournir un environnement contrôlé pour une croissance et une production optimale de microorganismes ou de cellules. Il sert à contenir, stériliser, aérer et à agiter un milieu. Il permet également de contrôler les paramètres physico-chimiques. Grâce à des capteurs In Situ, on peut connaître et mesurer la température, la pression, la vitesse d'agitation, le débit des gaz, le pH, le dioxygène dissous, le dioxyde de carbone dissous, etc... (**25**)

- f) La dernière étape consiste à filtrer, purifier et stériliser le bouillon obtenu pour ne récupérer que les vecteurs viraux. Ces derniers seront donc opérationnels et prêts à être injectés dans les cellules d'un malade.

3.2.3. Caractéristiques des différents vecteurs viraux

Les vecteurs viraux ne sont pas identiques, ne serait-ce que par leur structure virale (ADN, ARN, enveloppés ou non, antigènes...), mais ils diffèrent surtout par leurs capacités diverses (taille du gène incorporé, capacité d'intégration, types cellulaires visés, ...) Voici un tableau récapitulatif (**tableau 2**) montrant leurs inconvénients et leurs avantages. Il n'y a pas de vecteurs viraux parfaits, leurs différences expliquent leur utilisation selon les cas.

Tableau 2 : Caractéristiques des différents vecteurs viraux (16)

CARACTERISTIQUES	Adénovirus	AAV (Parvovirus)	Rétrovirus
Tropisme naturel	Large Cellules en prolifération et cellules quiescentes	Restreint Cellules en prolifération et cellules quiescentes	Restreint Cellules en prolifération (tous) ou quiescentes (spumavirus et lentivirus uniquement)
Persistance du vecteur dans les cellules	non	Oui (forme intégrée)	Oui (forme intégrée)
Taille limite de l'insert	7.5 à 30 kb	<5 kb	8 kb
Immunogénicité conférée par les vecteurs aux cellules infectées	forte	Faible à nulle	Faible
Facilité de production et de conservation du vecteur	+++	+/-	+ à ++
Champs d'application	Pathologies tumoraux	Pathologies chroniques	Pathologies chroniques

Prévalence des anticorps naturels dans la population Humaine	Approx. 50%	Approx. 30%	0% hors situation pathologique
Persistance du vecteur en milieu extérieur (possibilité de traitement par voie locale)	Forte (administration possible par voie respiratoire)	Forte (administration possible par voie orale)	Moyenne à faible (infection ex vivo ou injection systémique)
Titre après concentration (cfu/mL)	10^9 à 10^{11}	10^6 à 10^8	10^6 à 10^8
Absence de virus compétent pour la réplication	oui	oui	oui
Intégration dans le génome	non	oui	oui
Transferts de gènes viraux	oui	non	Non
Risques de mobilisation chez l'Homme par du virus sauvage	oui	oui	non

3.2.4. Effets indésirables

Comme dans tout traitement, on ne parvient pas à réaliser un transfert parfait... En d'autres termes, il existe des effets indésirables plus ou moins graves. Pourtant, si l'on a développé les thérapies géniques, c'est dans le but de les réduire et de parvenir à soigner des maladies jusque là orphelines sans traitement, ou des pathologies à l'issue fatale. Cependant, la chose n'est pas aisée.

Si on se base sur la théorie, on devrait s'attendre à ne rien observer de nuisible. Effectivement, si un gène est déficient, on le remplace par le variant fonctionnel et les fonctions physiologiques habituelles devraient se mettre en place. Malheureusement, de la théorie à la mise en pratique, deux phénomènes interviennent. Premièrement, on utilise un vecteur pour amener le gène sur son site et le transférer. Est-il inoffensif ? Et deuxièmement, le transfert est-il correctement réalisé par ce vecteur ? On va donc observer deux types d'effets indésirables : ceux liés au vecteur, et ceux liés à l'implantation du gène et de son expression.

- Les effets indésirables liés au vecteur (**tableau 2**) :

Un vecteur va pénétrer dans l'organisme, quel que soit le mode d'introduction du gène (in vivo, ex vivo, in situ). Or, un vecteur dérive d'un virus, c'est donc un corps étranger au sein d'un individu. Même si l'on enlève les parties dangereuses du génome (parties répliquatives et virulence), il y a toujours un potentiel antigénique présent. Autrement dit, il confère un éventuel pouvoir immunogène aux cellules cibles car celles-ci sont infectées... A noter que le mode ex vivo limite le risque de réaction inflammatoire, car on a un type de cellule bien précis qui se trouve être porteuse, donc on a moins de charge virale nécessaire au traitement alors que dans le mode in vivo, la spécificité est moins facile à obtenir. L'immunogénicité est variable selon les virus, les plus fortement immunogènes d'entre eux sont les adénovirus, il arrive même parfois qu'ils soient associés à des traitements immunosuppresseurs pour une meilleure tolérance **(26)**.

→ On peut avoir des effets indésirables de types inflammatoires avec éventuellement développement de maladies auto-immunes par mimétisme moléculaire (une structure du vecteur déclenche une réaction immunitaire et cette même structure ressemble à une autre de l'organisme, les anticorps se dirigent donc contre les deux).

→ On craint également d'éventuelles recombinaisons avec des virus sauvages.

- Les effets indésirables liés à l'implantation du transgène :

Lorsque le vecteur transfère le gène, ceci est réalisé de manière aléatoire en théorie... Autrement dit, le transgène s'insère n'importe où sur le chromosome et peut donc modifier l'expression d'un gène actif, voire activer la synthèse d'un gène « endormi » à proximité de son insert. On parle d'insertion génotoxique. Mais la probabilité qu'il s'insère au sein d'un gène actif est négligeable ($1 \cdot 10^{-5}$, soit sur 10^6 cellules traitées, une à dix d'entre elles voit un gène actif perturbé). Théoriquement, on ne devrait rien observer... **(27)**

Nous allons voir cependant au travers de l'exemple vu précédemment concernant le SCID-X à l'hôpital Necker (Paris) que deux enfants sur dix ont développé une leucémie après traitement par une thérapie génique.

Le traitement se réalisait en mode ex vivo, il consistait à introduire le gène fonctionnel codant pour un récepteur de l'interleukine 2 dans des précurseurs de lymphocytes. Le transgène considéré a été principalement inséré auprès d'un proto-oncogène qui a activé LMO2, un gène impliqué comme facteur de transcription dans l'hématogénèse et qui aurait donc favorisé une prolifération incontrôlée des cellules sanguines chez deux enfants.

Cette malheureuse expérience a donc montré qu'il existe des **zones privilégiées d'inserts**. Cependant, un troisième enfant a principalement reçu le transgène près de LMO2 et n'a pas développé de leucémie. Ceci tend à montrer qu'il existe **d'autres facteurs impliqués (27)**.

On retrouvera souvent des leucémies ou des lymphomes comme dans cette malheureuse expérience.

- Les problèmes d'expression du transgène :

L'expression du transgène n'est malheureusement pas stable. Effectivement, les séquences en charges de l'expression sont souvent reconnues par la cellule comme des parties étrangères et sont donc inactivées. Le transgène ne peut donc plus s'exprimer. Ou comme vu précédemment, les propriétés immunogènes des vecteurs vont provoquer la destruction des cellules modifiées **(26)**.

Il faudra donc procéder à des traitements réguliers en cas de tels phénomènes.

4. Espoirs portés par les thérapies géniques

Dans cette partie, nous nous contenterons d'analyser les questions que suscitent les thérapies géniques, les résultats obtenus jusqu'à présent et les conclusions que nous pouvons en tirer.

4.1. Origine des espoirs

La première question à se poser et à laquelle on peut répondre facilement est la suivante : pourquoi les thérapies géniques pourraient-elles être source d'espoir ?

De manière évidente, comme nous l'avons vu jusque là, on peut tout simplement répondre qu'elles permettraient de soigner des maladies pour lesquelles il n'existe pas de traitement (maladies orphelines ou maladies incurables jusqu'alors) et surtout pour toutes les sortes de maladies qui existent du moment que la cause génique est connue.

4.2. L'éthique : peut-on procéder à des thérapies géniques ?

La deuxième question légitime à se poser : en a-t-on le droit ?

Question qui s'impose car on s'attaque tout de même à l'essence même de l'organisme, au génome de l'individu, c'est-à-dire à ce qui fait de lui ce qu'il est. La réponse en est donnée par les nombreux essais en cours, en d'autres termes, on semble dire que oui. Déontologiquement parlant, les thérapies géniques somatiques paraissent tout à fait convenables : les patients entrant dans ces expériences sont volontaires et bien mis au courant de ce qu'ils vont subir. Qui plus est, on offre une possible solution à un problème qui est sans issue en ce qui concerne les autres thérapeutiques. On redonne ainsi le goût de se battre pour vivre à des patients qui semblent condamnés et qui

parfois ne se sentent déjà plus comme faisant encore partie du monde des vivants. Cela pourrait-il même être un devoir ?

Il faudra toutefois y faire attention, car certaines personnes peuvent finir par se prendre pour Dieu, refuser l'échec et s'obstiner, s'acharner sur un cas pour le sauver. C'est là toute la délicatesse du sujet car si l'on entrevoit ceci comme un devoir, n'oublions pas la volonté du patient avant toute chose, c'est peut-être cela le premier devoir d'un professionnel de santé quel qu'il soit. L'Histoire a montré d'ailleurs qu'un tel pouvoir dans les mains d'un Homme peut lui en faire perdre de vue la déontologie : des expérimentations ont déjà eut lieu sans contrôle d'un quelconque comité d'éthique ou sans l'avis des patients concernés comme le fit Stanfield Rogers en 1967 en inoculant le virus du papillome de SHOPE (virus induisant la synthèse de l'arginase) à 2 jeunes allemandes afin de corriger les déficiences en arginine de celles-ci, ou encore comme Martin Cline en 1980 avec des cas de thalassémie bêta-zéro **(13)**.

Le droit de les mettre en pratique existe mais il faut que celui-ci soit soumis à des règles bien définies, ce qui est le cas aujourd'hui comme pour n'importe quel médicament.

4.3. Les résultats doivent-ils encourager l'espoir ?

Si l'on peut se dire a priori que ces thérapies sont une réponse là où il n'y en a plus et que l'on en a le droit, sont-elles pour autant à la hauteur de nos attentes ?

Il est vrai que sur le papier, le principe est tout à fait alléchant. Mais en pratique, nous l'avons bien vu, l'utilisation des moyens mis en œuvre pour y parvenir est dangereuse. La connaissance parcellaire de notre génétique en est la cause ainsi que celle des vecteurs utilisés. Dans l'exemple vu concernant les 2 enfants atteints de SCID-X à l'hôpital Necker de Paris, la thérapie génique en cours a provoqué des leucémies (qui ne sont pas des pathologies anodines !) et les résultats de l'expérience ont montré que nous ne connaissons pas tout des mécanismes de l'insertion des gènes et de leur

interaction avec le reste du génome. Il faut donc avancer avec prudence semble-t-il. Pour autant, il existe des échecs certes, mais comme dans tout traitement médicamenteux, cela n'a rien de choquant en soi. Effectivement, dans toute étude sur un médicament, on note la présence de gens qui ne tolèrent pas le traitement. Le seul problème réel qui se pose ici, c'est que l'on s'attaque à la plus petite unité du monde vivant et que pour une modification bénigne, les conséquences peuvent être catastrophiques comme nous l'avons montré dans les effets indésirables. De plus, la fréquence de ces derniers peut se révéler plus ou moins importantes, dans le cas du SCID-X, deux enfants sur dix sont touchés ! Ajoutons à cela l'imprévisibilité (qui résulte du manque de connaissance) des personnes pouvant développer des leucémies suite à ce traitement, l'essai n'est donc pas concluant. De nombreux autres échecs sont à noter, comme l'affaire Gelsinger où un jeune Homme de 18 ans atteint d'un déficit en ornithine transcarbamylase partielle est mort des suites d'une injection trop importante d'un vecteur viral.

Si l'on note de nombreuses tentatives infructueuses, c'est tout simplement à cause du manque de connaissances. En effet, il faut tout de même signaler que dans la plupart des dits échecs, l'état s'était amélioré, mais des effets secondaires sont apparus. De nombreux problèmes ne sont pas encore résolus comme parvenir à créer un vecteur qui ne déclencherait pas de réactions immunitaires, qui ne se recombineraient pas avec un virus sauvage, qui serait spécifique d'un tissu donné, et qui garderait son efficacité de pénétration et de transfection, ou encore comme percer le secret de l'insertion des gènes (quels sont les mécanismes et les zones privilégiées ? comment repérer ces zones et comment y adresser spécifiquement le transgène ?).

Il faut donc poursuivre les recherches et surmonter les obstacles afin de parvenir à un « réel » résultat positif, sans compter qu'il existe tout de même des succès comme une thérapie génique pour la bêta-thalassémie commencée en 2007 sur un jeune homme de 18 ans à l'Hôpital Necker de

Paris, le vecteur utilisé était dérivé du VIH (vecteur lentiviral). Trente mois plus tard le patient n'a plus besoin de transfusion sanguine ! Cependant, les séquençages ADN ont montré que dans la moitié des cellules souches de la moelle présentant le transgène, on observe une insertion dans le gène HMGA2 (gène dont l'expression est augmentée dans plusieurs types de tumeurs cancéreuses, ce dernier jouant un rôle dans la prolifération cellulaire qui a dû aider à la guérison). Des essais complémentaires sont donc en cours pour évaluer le rapport bénéfice risque de cette thérapie car les risques de leucémies ou de lymphomes existent bel et bien **(28)**.

Ainsi donc nous pouvons conclure que de réels espoirs peuvent être portés par ces thérapies en dépit des résultats, car même s'il n'y a que peu de succès jusqu'à maintenant, les échecs sont en général dus à des effets secondaires qui peuvent être contournés par une meilleure connaissance des mécanismes d'insertions et par le développement de vecteurs plus inoffensifs et plus efficaces encore. Même si ces thérapies sont expérimentales depuis longtemps, et que l'on devrait en attendre des résultats positifs depuis quelques années, n'oublions pas que s'attaquer à l'ADN de l'Homme pour en percer les mystères, c'est comme demander à un individu d'apprendre par cœur l'encyclopédie, cela prend du temps ! Il faut donc faire preuve de patience.

CHAPITRE 2 – LA MALADIE D’ALZHEIMER

L’objectif de ce chapitre est de s’intéresser aux thérapies géniques actuellement en cours concernant la maladie d’ALZHEIMER (MA). Nous allons donc nous pencher dans un premier temps sur le phénomène de société, la clinique mais aussi surtout sur les connaissances actuelles concernant la physiopathologie et les gènes susceptibles de présenter un intérêt dans des traitements par thérapie génique. Dans un deuxième temps, nous développerons les études en cours et ce que l’on observe à l’heure d’aujourd’hui. Enfin, nous analyserons les résultats et ce que l’on peut en attendre.

1. Présentation et épidémiologie

1.1. Définition

La MA fait partie des maladies dites « neurodégénératives ». Cette catégorie regroupe toutes les neuropathies provoquant une dégénérescence des neurones qui conduit à la perte de fonctions et progressivement à la mort.

C’est aussi ce que l’on appelle une démence dont l’évolution est insidieuse et dont les lésions cérébrales sont tout à fait particulières (plaques séniles et dégénérescence neurofibrillaire) et n’apparaissent qu’à un stade tardif de la maladie **(29)**.

1.2. Un peu d'Histoire...

Le premier cas décrit se situe en 1906, Alois ALZHEIMER (**figure 13**) prend le cas d'une femme de 51 ans. Celle-ci présente des troubles massifs de la mémoire et de l'autonomie. En observant le cerveau de la patiente, il dénote alors la présence de lésions assez singulières et les rattache aux symptômes. Parallèlement, à cette époque, on connaissait ce qu'on appelait la démence sénile dégénérative, mais vu l'âge on ne pouvait soupçonner qu'il s'agit du même phénomène. Ainsi donc Alzheimer crût découvrir une nouvelle pathologie. En 1910, Emile KRAEPELIN, psychiatre renommé dans le service duquel travaillait ALZHEIMER, réalisa des observations similaires pendant les quelques années précédentes et donna alors à ces observations le nom de maladie d'ALZHEIMER. Mais en 1911, ces deux derniers s'aperçoivent qu'il s'agissait en fait des lésions que l'on observait dans la démence sénile dégénérative et ne relevait pas d'une quelconque pathologie spécifique.

Par conséquent, ils conclurent à un processus anormal de la démence sénile dans le cas de cette femme. C'est ce que l'on a adopté comme théorie jusqu'à nos jours pour définir la MA (**29**).



Figure 13 : Alois ALZHEIMER (30)

1.3. Epidémiologie : quelques chiffres

Cette maladie constitue à l'heure actuelle un problème majeur des pays développés. Avec l'amélioration de la qualité de la vie et de la qualité des soins, la population est vieillissante. Ainsi donc, on augmente les possibilités de voir des individus développer celle-ci.

En France, les chiffres sont éloquentes. 5% de la population âgée de plus de 65 ans est touchée et 15% pour les plus de 85 ans. Autrement dit, 860 000 personnes en souffrent en 2007. On dénombre 160 000 nouveaux cas chaque année et les prévisions pour 2020 ne sont guères attrayantes. Une personne sur quatre devrait être touchée pour les plus de 65 ans soit 1.3 millions de personnes d'après les estimations de l'INSEE. Il faut noter également la présence de 20 000 cas de personnes de moins de 65 ans. Elle représente dans notre pays la quatrième cause de mortalité.

Dans le reste du Monde, le phénomène est surtout présent dans les pays développés (exemple : plus de 4 millions de malades aux Etats-unis) et l'on dénombre 25 millions de personnes touchées **(31)**.

En France, ces chiffres dénotent la nécessité d'établir des mesures de santé conséquentes pour dépister, prendre en charge la maladie et pour aider la recherche, notamment les travaux en cours sur le génotypage à haut débit.

2. Physiopathologie

Dans cette partie, nous allons nous attaquer à l'essence même de la maladie, les gènes impliqués, et les processus dégénératifs.

2.1. Les formes familiales

Il s'agit de cas d'apparition de la maladie avant 65 ans dont les mutations ont été caractérisées et dont la transmission a été réalisée par l'ascendance. La pénétrance est complète, c'est-à-dire que les personnes portant les mutations développeront inexorablement la maladie dans les alentours de 55 ans en moyenne. Trois gènes sont mis en cause aujourd'hui et de nouveaux sont découverts. C'est une maladie à transmission autosomique dominante **(35)**.

2.1.1. La théorie admise par la communauté scientifique

A. Les peptides β amyloïdes et plaques séniles

Nous abordons ici la cause principale de la maladie d'ALZHEIMER. Il faut savoir avant toute chose qu'effectivement cette maladie est fondamentalement d'origine génétique même si des facteurs environnementaux ou pathologiques peuvent venir s'ajouter, nous le verrons par la suite.

Les observations au microscope optique permettent de voir des éléments typiques de la maladie.

Concrètement, on observe des dépôts encore appelés plaques séniles autour des neurones (**figure 14**).

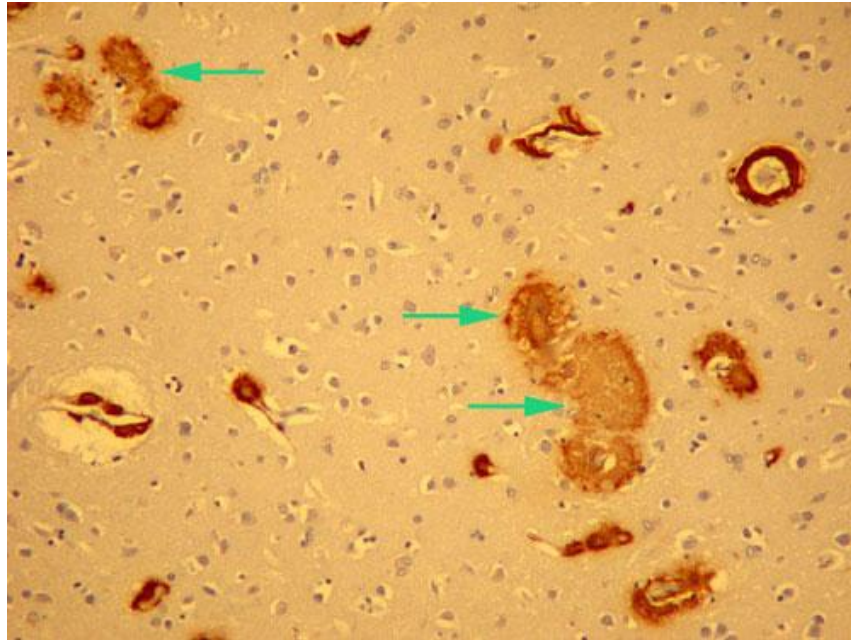


Figure 14 : Observation au microscope optique par immunohistochimie d'une coupe de tissu nerveux chez un patient atteint d'ALZHEIMER. Les flèches vertes indiquent les dépôts de peptides β amiloïdes (amas bruns) (32)

On note une présence très élevée de ces plaques chez les patients atteints d'ALZHEIMER.

En ce qui concerne les observations au microscope électronique, on peut voir des structures filamenteuses de six à neuf nanomètres de long. Ces faisceaux filamenteux sont extracellulaires (**33**).

Pour ce que l'on observe à l'échelle moléculaire :

- On sait à l'heure actuelle, que c'est la protéine β amyloïde qui est responsable de la formation de ces plaques ou tout du moins une forme particulière, ainsi que d'autres constituants que nous verrons également par la suite (**34**).

- Origine du peptide β amyloïde.

Cette protéine est produite à partir d'un précurseur transmembranaire appelé protéine APP (amyloid precursor protein) porté sur le chromosome 21 (on observe d'ailleurs un développement de plaques amyloïdes chez les trisomiques). Ceci est un phénomène parfaitement physiologique présent chez n'importe quel individu. Des enzymes appelées sécrétases vont effectuer des clivages sur la protéine APP dans son domaine transmembranaire. On en trouve plusieurs types (α , β , et γ) (**figure 15**).

Si c'est l' α -sécrétase qui agit, on obtiendra deux peptides : APPs α et C83.

Si c'est la β -sécrétase qui agit, on obtiendra deux autres peptides dont celui qui nous intéresse : APPs β et C99.

La γ -sécrétase entrera ensuite en action sur C83 et C99 dont les rôles sont mal connus. Il s'agirait de facteurs de transcriptions.

En ce qui concerne les peptides APPs α et APPs β , il semble qu'il s'agisse pour l'heure de facteurs neurotrophiques. Leur rôle n'est pas encore bien connu non plus.

Le clivage des peptides C83 et C99 donnera respectivement P3 et A β ₄₀ (peptide amyloïde) (**35**).

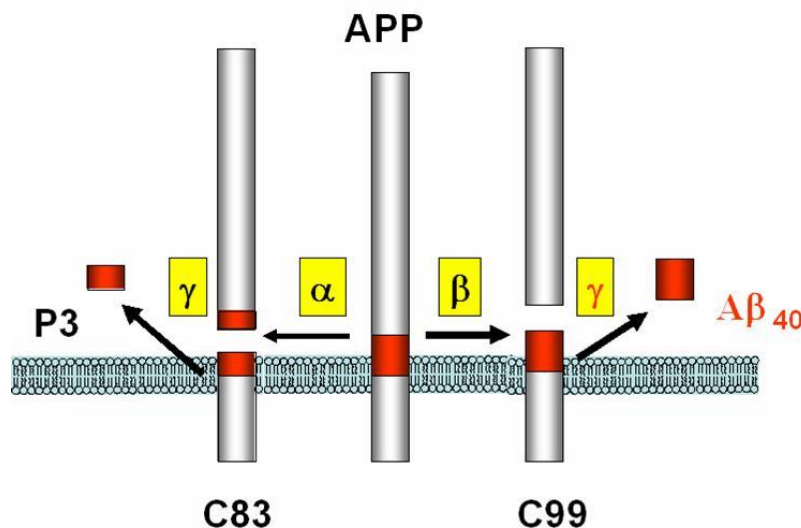


Figure 15 : Clivages du gène APP (36)

La voie de l' α -sécrétase est protectrice, elle constitue une barrière à la voie de l'amyloïdogénèse (voie β) **(35)**.

- Que se passe-t-il donc au sein d'un ALZHEIMER ?

Les formes familiales constituent 1% des cas.

On observe en fait une mutation du gène APP (15 mutations existantes sur une dizaine de sites du gène APP). Nous n'entrerons pas dans le détail de ces mutations mais ce qu'il faut savoir, c'est que l'on se dirige vers la formation surnuméraire d'un peptide avec deux ou trois acides aminés de plus dans la séquence ($A\beta$ 42 et $A\beta$ 43), la mutation ayant modifié le site de clivage. Le peptide ainsi obtenu étant moins soluble qu' $A\beta$ 40, il se dépose beaucoup mieux et forme des plaques plus facilement **(35)**.

B. Rôle des présénilines

Les mutations du gène APP n'expliquant pas tous les cas, les recherches ont été poursuivies mettant à jour deux gènes nouveaux qui entraînent dans un mécanisme de pathologie familiale. Il s'agit des gènes PS1 et PS2 qui constituent des protéines transmembranaires présentes dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Elles pourraient jouer un rôle sur la transmission intracellulaire. On connaît toutefois plusieurs choses :

- En ce qui concerne PS1 : ce gène situé sur le chromosome 14 code pour une protéine entrant dans le complexe enzymatique de la γ -sécrétase , il permet donc de cliver la protéine APP dans sa séquence transmembranaire. On a dénoté la présence de formes mutées chez 70% des individus ayant une forme familiale. Ce qui a pour conséquence de modifier le site de clivage et d'aller vers la production d'un peptide $A\beta$ 42 ou 43.
- Pour PS2 : celui-ci, situé sur le chromosome 1 présente une forte homologie de séquence avec PS1 mais sa contribution paraît plus mineure.

L'existence de cas précoces sans mutation du gène APP ou des gènes PS1 et PS2 tendent à faire supposer la possibilité que d'autres gènes soient impliqués dans les formes familiales **(35)**.

C. Conséquences de la synthèse de peptides β amyloïdes pathologiques et dégénérescence neurofibrillaire (DNF)

A partir de là, une cascade neurologique d'évènements vont se succéder.

- La dégénérescence neurofibrillaire : les peptides A β 42 ou A β 43 provoquent l'activation de divers récepteurs, notamment la protéine APP mais surtout un récepteur de la neurotrophine (p75) qui est responsable de stress oxydatif et augmente l'entrée de calcium dans les neurones. Ainsi, la concentration de calcium intracellulaire augmentant, certaines voies métaboliques sont activées et provoque une hyperphosphorylation de la protéine Tau.

La protéine Tau provient d'un gène localisé sur le chromosome 17. Il s'agit de ce que l'on nomme communément une MAP (Microtubule Associated Protein), autrement dit, cette protéine se fixe aux microtubules de la cellule neuronale et leur permet d'exercer une activité normale en stabilisant leur structure (rôle des microtubules : structure, transport de protéines et de vésicules vers les extrémités axonales).

Par conséquent, lorsque cette protéine est anormalement phosphorylée, elle se désolidarise des microtubules, on retrouve donc la protéine Tau pathologique dans le corps cellulaire, les dendrites et même dans le LCR (liquide céphalo-rachidien) au lieu de la retrouver normalement au niveau des axones. On observe ainsi une altération des flux axoniques, une régression axonale d'une part, et la formation de fibrilles (polymères de motifs synthétisés à partir des protéines Tau pathologiques) d'autre part. Ces fibrilles constituent à

proprement parler de la DNF (**figure 16**) et contribueraient à la mort cellulaire observée dans la maladie d'ALZHEIMER (**34**).

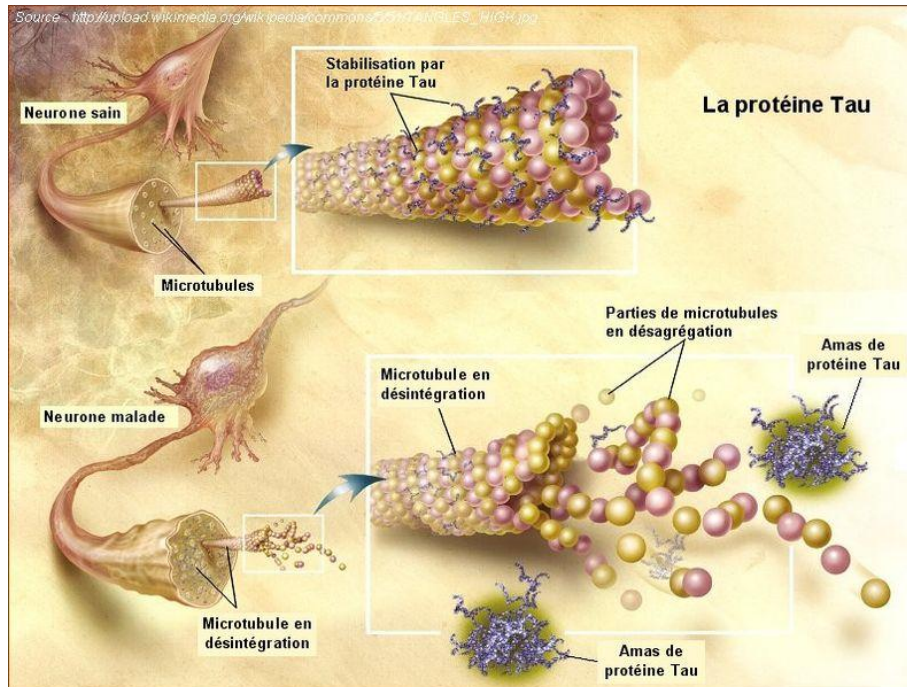


Figure 16 : Comparaison de la protéine Tau normale et de la protéine Tau pathologique entraînant le processus de la DNF (37)

- Les peptides amyloïdes β semblent être impliqués dans l'activation de certaines caspases (protéines pro-apoptotiques) qui entraînent l'apoptose et donc la mort cellulaire des neurones touchés, mais le lien n'est pas clairement établi pour l'heure car la DNF semble impliquée aussi (**34**).
- Les peptides amyloïdes β empêchent la production et la libération d'acétylcholine d'où les problèmes amnésiques observés dans la maladie (**34**).
- Ils peuvent se lier aux récepteurs RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) qui provoquent l'activation de cellules microgliales impliquées dans la production de radicaux libres provoquant la libération de cytokines pro-inflammatoires (**34**).

- Ils forment surtout les plaques amyloïdes observées au niveau extracellulaire avec le concours de l'apolipoprotéine E4. Ce qui a pour effet d'exacerber les mécanismes de morts cellulaires comme les peptides seuls. A savoir donc, la production d'espèces réactives de l'oxygène (peroxydation lipidique), de DNF, l'activation des caspases et de réactions inflammatoires **(34)**.

Il faut tout de même savoir que les neurones principalement touchés sont les neurones pyramidaux car d'autres types résistent aux mécanismes de la cascade neuropathologique comme les astrocytes et les interneurons. Ces résistances sont dues à la présence intracellulaire de protéines tampons fixant le calcium, les CBPN (Calcium Binding Protein Neurons). Le calcium semble être donc une étape clé de la maladie **(34)**.

2.1.2. Récentes découvertes

On peut retrouver des découvertes très récentes sur le site de la Fondation ALZHEIMER concernant les origines génétiques de la maladie. En effet, le plan ALZHEIMER regroupe plusieurs mesures de santé publique mais également le financement de la recherche. En réalisant des GWAS, on a découvert deux nouveaux gènes susceptibles d'induire l'état pathologique, il s'agit de CLU (gène de la clusterine encore appelée apolipoprotéine J) situé sur le chromosome 8, et de CR1 (gène du récepteur 1 du composant 3b/4b du complément) situé sur le chromosome 1. Ceux-ci seraient impliqués dans l'élimination du composant A β . Ce qui pourrait ouvrir de nouvelles pistes concernant les thérapies géniques **(8)**.

Il semblerait que ces gènes soient plutôt des facteurs de risques que des déclencheurs de la maladie d'ALZHEIMER.

2.2. Les formes sporadiques

Ces formes représentent 99% des cas. Elles sont issues non pas d'une hérédité quelconque mais surviennent spontanément au sein d'une lignée à la faveur de facteurs de risques et après l'âge de 65 ans.

2.2.1. Les facteurs de risques génétiques

Comme vu précédemment, il semblerait que CLU et CR1 en fassent partie. Mais le principal connu et clairement identifié est le gène de l'apolipoprotéine E4 (Apo E).

On retrouve dans la population 3 allèles majeurs du gène Apo E (chromosome 19), à savoir E2 (7% de la population), E3 (78%), E4 (15%). On a remarqué que la plupart des sujets malades portaient l'allèle E4 qui aurait une tendance à augmenter le LDL-cholestérol athérogène. Mais celui-ci constitue un facteur de risque, c'est-à-dire qu'il ne permet pas le déclenchement de la maladie d'une part, et donc qu'une personne le portant n'est pas forcément atteinte d'autre part.

Près de 400 études ont permis de montrer que les porteurs d'un seul allèle avaient trois à cinq fois plus de risques de développer la maladie et que les porteurs de deux allèles en avaient dix à douze fois plus.

L'hypothèse physiopathologique de l'Apo E4 se constitue de la manière suivante : l'Apo E4 serait une protéine chaperonne qui après fixation sur le peptide amyloïde β formerait un complexe insoluble et permettrait donc l'accumulation dans les plaques séniles **(35)**.

Récemment, une équipe de scientifique a montré qu'il existe un nouveau facteur de risque génétique : le gène LRP-1 (LDL receptor-related protein 1). Le Docteur ZLOKOVIC (University of Rochester Medical School) et son équipe ont montré qu'il s'agissait d'un transporteur au niveau de la barrière hémato-encéphalique en charge de l'élimination du peptide A β . Un

déficit de son activité (qui semble diminuer avec l'âge) entraînerait donc une accumulation et permettrait la formation des plaques. Ces travaux ont été publiés dans le numéro de décembre de la revue *Journal of Clinical Investigation*. En réalisant des expériences sur des souris, et en leur injectant des peptides amyloïdes chez des sujets adultes et âgés, ils ont noté une baisse significative de la clairance du peptide amyloïde liée à une diminution de l'expression de LRP-1 chez les sujets âgés **(38)**.

2.2.2. Les facteurs de risques autres

C'est une maladie multifactorielle, on dénombre une grande quantité de facteurs de risques à l'heure actuelle en dehors des facteurs génétiques **(39)**.

- L'âge : il s'agit du facteur de risque principal et c'est certainement le plus important quand à la possibilité de développer la maladie. En effet, les observations montrent une croissance exponentielle du nombre de cas avec le vieillissement de nos populations. On remarquera d'ailleurs comme nous l'avons vu précédemment que cette maladie est un phénomène de société des pays développés, autrement dit des pays où l'espérance de vie est la plus forte.
- Un niveau d'éducation faible : il semble que l'on puisse dire qu'au-delà de six ans d'études, le niveau confère comme une protection. Même si la maladie touche toutes les couches de la population, la fréquence des cas est bien moindre dans les populations ayant étudié au moins six ans. On peut supposer donc que durant ces années se forment une sorte de « capital » mémoire, ou que la stimulation neuronale provenant de l'apprentissage pourrait augmenter la capacité des neurones voir leur durée de vie. On peut donc voir le cerveau comme un muscle en quelque sorte, plus il travaille, plus il est efficace.

- Facteurs de risques vasculaires : on y retrouve tous les facteurs cardiovasculaires possibles, ces derniers étant à l'origine de pathologies cérébrovasculaires. On y inclut donc l'hypertension artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, les cardiomyopathies, le tabac, l'alcool, ...
- Les traumatismes crâniens graves : chez les boxeurs par exemple, où l'on remarque le développement des modifications moléculaires d'un ALZHEIMER.
- Les antécédents de dépression : ceux-ci altèrent la mémoire.
- Les pesticides : comme pour la maladie de PARKINSON, ils sont suspectés mais rien n'est démontré à ce jour.
- L'aluminium : on le suspecte mais rien n'est confirmé quand à son rôle dans le développement de la maladie.
- Les déficits en facteurs neurotrophiques : ils procurent des capacités d'autoréparation aux cellules nerveuses.

2.3. Potentielle remise en cause de l'amyloïdogenèse comme facteur déclenchant de la maladie ?

La théorie des peptides A β admise par la communauté scientifique semble remise en cause par l'un des essais en cours du laboratoire Eli Lilly. En effet, ce dernier s'était lancé dans le développement d'un inhibiteur de l'amyloïdogenèse : le Semagacestat.

Cependant, lors des essais cliniques de phase 3, ces derniers ont montré que le médicament ne ralentissait pas l'évolution de la maladie. Le problème n'est pas que le médicament n'exerce pas son action. Comme le déclare le Dr Eric SIEMERS, directeur médical de l'équipe de recherche sur l'ALZHEIMER chez Eli Lilly : "Nous avons pu acheminer une quantité suffisante de Semagacestat dans le cerveau de ces malades pour avoir un effet (sur la

production de bêta-amyloïdes) mais malheureusement les résultats n'ont pas été ce que nous escomptions". Par conséquent, si l'on a bien diminué les quantités de peptides amyloïdes produites, on devrait noter une amélioration ou tout du moins un ralentissement de la progression de la maladie à supposer que ce soit bien l'un des mécanismes mis en cause. On peut donc se demander si les plaques amyloïdes ne sont pas plutôt une conséquence d'un autre mécanisme physiopathologique comme la DNF par exemple plutôt que la cause **(40)**.

Faut-il alors remettre toute la théorie en cause? Rien n'est moins sûr car on observe une aggravation de l'état des patients d'après les résultats de l'étude. Ceci tend plutôt à se demander si la molécule n'aurait pas des effets neurotoxiques par elle-même ou n'aurait pas un autre mécanisme d'action supplémentaire qui détruirait les fonctions cognitives. Toujours est-il que par principe de précaution, il va falloir vérifier ces hypothèses.

2.4. Evolution corticale

Avant toute chose, il faut savoir que les lésions ne sont pas forcément immédiatement visibles en imagerie. Les patients atteints développent des symptômes bien avant qu'on observe une quelconque atrophie, ce qui rend le diagnostic très délicat. Toutefois, l'évolution se dirige irrémédiablement vers une atrophie corticale avec une dilatation des ventricules.

Il faut noter que l'atrophie corticale n'est pas homogène. En effet, elle touche préférentiellement certaines zones du cerveau et suit un ordre bien précis dans les atteintes. Les lésions observées se manifestent par la présence d'anticorps dirigés contre les protéines pathologiques **(41)**.

On observera des lésions à l'imagerie seulement lorsque le malade sera à un stade tardif de la maladie **(figure 17)**.

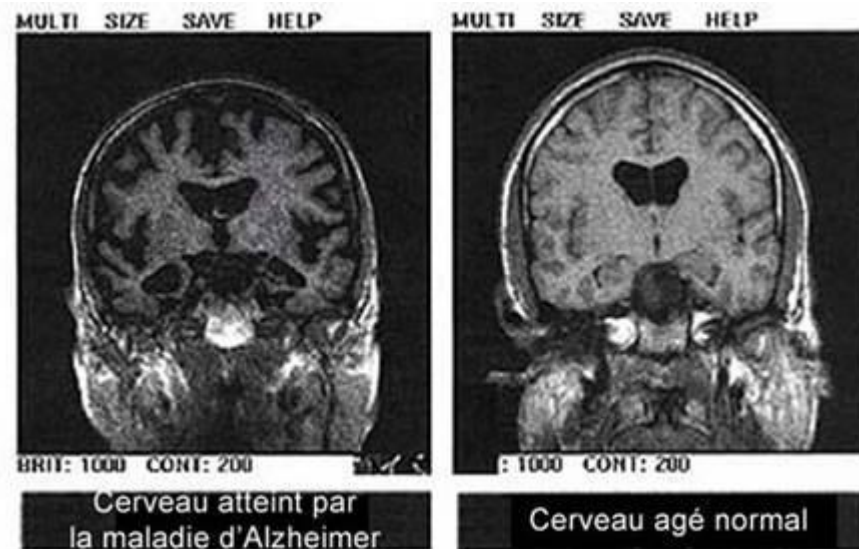


Figure 17 : Comparaison à l'IRM d'un cerveau normal et d'un cerveau atteint par la Maladie d'ALZHEIMER à un stade tardif (42)

2.4.1. Topographie des lésions et ordre d'apparition

Celles-ci n'apparaissent pas au hasard et obéissent à des lois bien précises qui nous échappent encore.

En ce qui concerne les lésions $A\beta$, elles ne sont pas sélectives, c'est-à-dire qu'elles vont se trouver dans de très nombreuses zones corticales, sans que l'on observe forcément tout de suite une atrophie.

En revanche, les lésions tau sont fortement intéressantes. Effectivement, la DNF progressive qui s'ensuit correspond précisément à l'apparition elle aussi de l'atrophie corticale et des symptômes qui possède un ordre bien établi, en voici les étapes successives **(41)** :

- Atteinte du cortex périrhinal : région entre le cortex hippocampique et temporal.
- Atteinte du cortex entorhinal

- Atteinte de l'hippocampe, de l'amygdale (mémoire) et du noyau de Meynert (régulation de l'éveil et de la vigilance d'où des troubles du sommeil).
- Atteinte du lobe temporal.
- Atteinte de l'ensemble du cortex associatif (temporal, pariétal, frontal symptomatologie aphaso-apraxo-agnosique) et des noyaux sous corticaux.
- Atteinte des régions corticales primaires, motrices et sensorielles (troubles des fonctions motrices).

On peut observer cette évolution sur la **figure 18**.

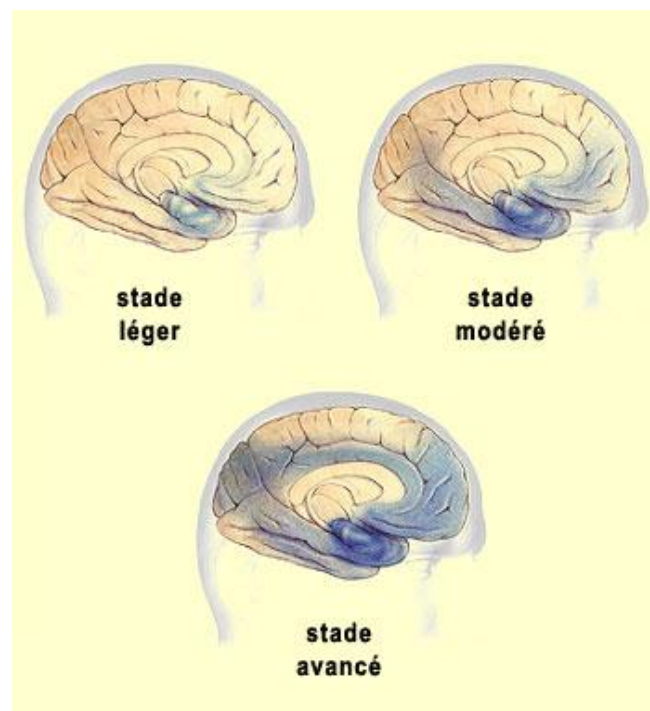


Figure 18 : Evolution corticale progressive des atrophies observées (44)

2.4.2. Conséquences cliniques

Les principaux symptômes sont d'ordres cognitifs et neuropsychiatriques. En effet, l'altération de la mémoire à court terme est le tout premier signe à apparaître. La personne exprime en général des difficultés à acquérir de nouvelles connaissances, ou à retenir simplement le

nom de nouvelles personnes. Puis suit en général, la disparition de la mémoire à long terme (souvenir d'enfance, etc....).

On observe ainsi surtout, une perte de facultés diverses, comme l'exercice de simples tâches ménagères, aller faire les courses, s'habiller, se laver (syndromes apraxiques), etc.... On assiste en fait progressivement à une perte d'autonomie (difficultés à se débrouiller seul et à planifier) et à un changement de personnalité. Une dépression peut se greffer sur la maladie car bien souvent pendant des épisodes de celle-ci (encore légers), le patient se rend bien compte qu'il ne va pas. Des troubles du sommeil peuvent s'instaurer. Les aphasies font également parties des symptômes classiques, la personne a du mal à s'exprimer, il lui manque souvent des mots ou elle en invente de nouveaux. Dans les stades terminaux, l'aphasie se caractérise par un mutisme totale, il reste parfois encore la présence de grognements, de bruits diverses.

On note aussi dans des stades avancés, une incapacité à suivre une conversation, à s'orienter dans le temps et dans l'espace, à reconnaître des visages, des objets (agnosie).

Dans les stades sévères, les troubles de la mémoire à long terme sont accompagnés bien souvent de troubles de l'humeur, de délires, voire d'hallucinations.

La dernière chose intéressante qu'il est nécessaire d'aborder dans ce paragraphe, c'est la présence de cas un peu particuliers. Il s'agit des stades dits pré-déméntiels encore appelés stades précliniques ou asymptomatiques. Autrement dit, il s'agit de personnes chez qui on observe des atrophies corticales présentes avec des lésions A β et tau, mais chez lesquelles on n'observe aucun signe clinique. Ils n'ont pas de symptômes cognitifs ni aucun des autres symptômes neurologiques éventuels... La seule hypothèse donc possible : ce sont bien des malades atteints d'ALZHEIMER mais ils ont dû développer un « mécanisme de compensation ». La maladie ne se développera qu'une fois, un nombre suffisant de neurones détruits comme dans la maladie de Parkinson où l'on sait qu'elle ne se déclare que lorsque plus des 2/3 des neurones dopaminergiques ont été détruits **(41)** **(43)**.

3. La stratégie d'attaque en thérapie génique et les techniques utilisées

Maintenant que l'on connaît les mécanismes impliqués dans la maladie et les enjeux, on peut y voir plus clair quant à la manière de procéder pour soigner celle-ci par les gènes.

3.1. Rappels

Jusque là, on a vu que plusieurs gènes pouvaient être impliqués dans la maladie, à savoir principalement le gène APP, mais aussi les gènes PS1 et PS2 (en ce qui concerne les formes familiales). Les facteurs de risques génétiques semblent répertoriés pour l'heure, les gènes CLU, CR1, LRP-1 (par déficit provenant de l'âge) et Apo E4. Ce qui nous ouvre donc de nombreuses pistes à priori pour un traitement par thérapie génique. Il suffirait de remplacer les gènes mutés ou déficients par un gène fonctionnel.

3.2. Les études en cours

Malgré toutes les possibilités citées ci-dessus, on ne s'intéresse pas à l'heure actuelle à remplacer ces gènes par leurs versions fonctionnelles. Il est cependant fort probable qu'elles soient utilisées un jour en cas d'échec pour la stratégie en cours.

En effet, si l'on ne s'intéresse pas pour l'heure à ces voies physiopathologiques, c'est parce qu'on sait qu'il existe des voies d'autoréparation des neurones qui viennent compenser les destructions engendrées par les divers mécanismes de la maladie et que ce mécanisme d'autoréparation est présent chez tous les patients (contrairement au gène APP par exemple, qui sera présent uniquement dans les formes familiales où

le gène est muté, ce qui limite grandement le champ d'action). Il s'agit en réalité d'amener sur le site nerveux des neurotrophines.

3.2.1. Que sont donc les neurotrophines ?

Les neurotrophines constituent un groupe de protéines ayant une séquence proche de cent vingt acides aminés en général. Elles sont impliquées dans la survie, la croissance et/ou la différenciation cellulaire des neurones et d'autres types cellulaires.

On en trouve quatre :

- Le facteur de croissance neuronal encore appelé NGF (Nerve Growth Factor)
- La neurotrophine 3 appelée NT3
- La neurotrophine 4/5 appelée NT-4/5
- Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau appelé BDNF

Leurs cibles sont constituées de deux récepteurs transmembranaires : le récepteur p75 et les récepteurs à activité de tyrosine kinase (trkA, trkB, trkC) qui sont plus ou moins spécifiques selon les types de neurotrophines (**tableau 3**) (45).

Tableau 3 : Récepteurs des neurotrophines (les grandes croix en gras indiquent les récepteurs avec la plus grande affinité, les petites ceux pour lesquels l'affinité est faible)
(45)

	P75	trkA	trkB	trkC
NGF	X	X		
NT3	X	x	x	X
NT-4/5	X		X	x
BDNF	X		X	

3.2.2. Le NGF : cible de la thérapie génique contre l'ALZHEIMER

Pour rappel, le NGF est impliqué dans la synthèse de signaux de survie pour les neurones et permet leur développement.

La stratégie va donc consister à transférer le gène du NGF en vue d'augmenter sa production et de protéger les cellules nerveuses des effets apoptotiques des plaques séniles et de la DNF. Il faut pour cela, amener les vecteurs en un lieu bien précis du système nerveux central. L'avantage de s'attaquer à ce gène est tout simplement qu'il permet a priori de soigner toutes les formes de la maladie d'ALZHEIMER (familiales ou sporadique).

3.2.3. 1^{ER} essai clinique

La première tentative fut réalisée par l'équipe du professeur TUSZYNSKI de l'Université de Californie à San Diego en 2001. Ces derniers, notant dans des études sur des rongeurs une nette amélioration de la mémoire et une baisse de la dégénérescence cellulaire des neurones cholinergiques lorsque ceux-ci furent traités par le NGF, décidèrent de lancer le même type d'expérience pour des hommes. L'essai réalisé est un essai de phase 1, il consiste donc principalement à vérifier la sûreté pour l'Homme du traitement mis en place et d'avoir une première idée sur l'efficacité dans la lutte contre la maladie **(46) (47)**.

- Présentation

L'expérience débute le 20 juin 2001 pour se terminer le 10 décembre 2009.

Sponsor : The Shiley Family Trust

Collaborateurs : Institute for the Study of Aging

University of California, San Diego

Informations fournies par : National Institute on Aging

Il s'agit d'un essai de phase 1 **(46)**.

- Protocole

Il va consister à réaliser une thérapie génique en mode EX VIVO.

Tout d'abord, il est légitime de se demander pourquoi on ne donne pas cette protéine en injection IV après l'avoir produit grâce aux biotechnologies. En effet, il serait certainement plus facile et moins coûteux de procéder ainsi. La réponse est on ne peut plus simple. Si l'on injecte cette protéine dans la circulation, celle-ci est bien trop grosse pour passer efficacement la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Cette voie est donc inutilisable et quant à penser à l'injecter directement sur son site d'action, il semble que le NGF soit très mal toléré. D'où l'intérêt de procéder par thérapie génique **(46) (47) (48)**.

Les chercheurs opèrent donc en trois grandes étapes :

- a) Prélèvement de fibroblastes de peau du patient. Ces cellules présentent l'intérêt de pouvoir être prélevées aisément, cultivées facilement et de pouvoir être infectées par des rétrovirus. Le fait qu'elles proviennent du patient ne posera donc pas de problèmes de compatibilités lors de leurs insertions dans ce dernier.
- b) Transfert du gène d'intérêt par des rétrovirus : le NGF.
- c) Réinjection locale (cerveau antérieur basal) des fibroblastes ayant subi la transformation au niveau des lésions. Les fibroblastes présentent la particularité d'avoir un potentiel de division limité mais compensé par une longue persistance IN VIVO. Ils devront sécréter le NGF de manière suffisante pour pouvoir contrer l'apoptose des neurones cholinergiques et leur dégénérescence. **(46) (47) (48)**

- L'échantillon

Celui-ci se compose de 8 personnes devant regrouper certains critères pour être accueilli au sein de l'essai **(46)**.

- Critères d'acceptabilité

- a) Diagnostic neurologique de probable maladie d'ALZHEIMER.
- b) Stade précoce de la maladie (maximum trois ans après le commencement).
- c) Capacité à parler et comprendre normalement.
- d) Capacité à comprendre les risques encourus par cet essai
- e) Accepter de se rendre régulièrement à San Diego et de recevoir des visites de contrôle.
- f) Accepter de cesser la prise de tout médicament pour l'ALZHEIMER pendant les dix-huit premiers mois. **(46)**

- Résultats et conclusions

Deux patients sur les huit ont présenté des mouvements brusques lors de l'injection qui se déroulait sans anesthésie générale (donc chez des patients conscients). Les conséquences en furent dramatiques car ceci déclencha des hémorragies cérébrales qui furent fatales pour l'un d'entre eux.

Les six autres patients n'ont en revanche présenté aucun effet indésirable lié au NGF et à l'opération (qui se déroula sous anesthésie générale cette fois-ci) après une période de vingt-deux mois. D'après deux tests réalisés pour évaluer l'état cognitif dans la maladie d'ALZHEIMER, le MMSE (Mini-Mental Status Examination) et l'ADAS (Alzheimer Disease Assessment Scale), on estime une réduction du déclin cognitif de 36 à 51%. On dénote également une forte augmentation de l'activité métabolique des neurones grâce à des PET-Scan. L'autopsie de quatre des patients en 2008 révèlent une croissance des cellules neuronales. Il semble que ces résultats

soient prometteurs. Cependant, ils sont à nuancer et à prendre avec d'extrêmes précautions. Nous pouvons voir au travers du **tableau 4** ci-dessous les divers avantages et inconvénients de cette expérience. Mais nous pouvons d'ors et déjà conclure que d'autres essais sont à réaliser **(47)**.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de l'essai clinique de phase 1

Avantages	Inconvénients
réduction du déclin cognitif	Deux des patients ont subi des hémorragies cérébrales mais elles sont à relativiser car elles résultent de l'opération et non de la thérapie en elle-même.
Augmentation de l'activité métabolique des neurones cholinergiques	Pas d'études avec un échantillon de sujets sains (possibilité d'effet placebo)
Croissance des neurones confirmée chez quatre des sujets	Echantillon très réduit (huit personnes seulement)

En conclusion, suite à cette première expérience, on note des résultats a priori prometteurs mais dont la véracité reste à vérifier et à compléter par d'autres études (celles que nous allons voir par la suite).

3.2.4. Deuxième essai clinique

Cette deuxième étude, réalisée au Rush University à Chicago par le chercheur J. SIFFERT vise à étudier le CERE 110, un traitement à base de vecteur viraux administrés IN VIVO dans l'organisme cette fois-ci **(49)**.

- Présentation

Cette expérience débute le 13 juillet 2004 pour finir le 30 juin 2010. Elle a pour but d'évaluer la sécurité, la non toxicité, et l'efficacité du CERE 110.

Sponsor : CEREGENE

Il s'agit d'un essai de phase 1 **(49)**.

- Protocole

On réalise un traitement par injection contenant des vecteurs viraux, en l'occurrence des AAV. Ceux-ci contenant le gène d'une neurotrophine et comme précédemment, il s'agit du NGF. L'injection a été faite IN VIVO (IN SITU plus précisément dans des conditions stéréotaxiques) dans la région basale antérieure du cerveau contenant le noyau basal de Meynert, là où la maladie commence son cheminement et où se trouvent des neurones cholinergiques. Les patients ont reçu des doses croissantes du traitement pour évaluer les possibilités posologiques et la tolérance de ce dernier. Quatre injections (dose A et B) furent réalisées suivies de six injections à la dose C. Les patients seront observés pendant vingt-quatre mois puis auront un suivi annuel. Les vecteurs viraux sont sensés transmettre le gène du NGF. Ceci va permettre ainsi une augmentation de la production de la protéine NGF favorisant l'activité métabolique des neurones cholinergiques visés et une diminution de la régression de ces derniers **(49)**.

- L'échantillon

Il se compose de six personnes sur le site du Rush University **(49)**.

- Critères d'acceptabilité

- a) Age : 50 à 80 ans.
- b) Sexes : homme ou femme.
- c) Diagnostic de MA.
- d) MMSE de 16 à 28 inclus.
- e) Pas d'anomalies neurologiques ou autres empêchant les examens.
- f) Pas d'antécédents de dépression majeure durant les deux dernières années.
- g) Vue et audition adéquate pour subir les examens neuropsychologiques.
- h) Bonne santé psychique.
- i) Capacité du patient à entendre et comprendre ce dans quoi il s'engage.
- j) Présence d'une tierce personne comme substitut décisionnel (désignée par le patient) éventuellement.
- k) Pas de traitements incluant des effets cholinergiques ou anti-cholinergiques.
- l) Pas d'antécédents de cancers, d'abus d'alcool, ou de transaminases supérieures à cinq fois la limite. **(49)**

- Résultats et conclusions

D'après cet article, les données de l'expérience semblent montrer une diminution du déclin cognitif. La tomographie par émission de positon (TEP) et les scanners montrent une augmentation de l'activité métabolique dans la région du noyau basal de Meynert.

Les améliorations confirment celle du premier essai clinique réalisé avec des fibroblastes. Résultats attendus puisqu'en fin de compte rien n'a changé (utilisation dans tous les cas du NGF) si ce n'est la technique utilisée pour apporter le gène d'intérêt. Mais il semblerait donc que les vecteurs viraux aient bien permis de transmettre le gène. Le traitement semble bien toléré, il n'y a pas d'effets indésirables notables. Ceci, amène donc CEREGENE à conduire un nouvel essai clinique de phase 2 cette fois-ci **(50)**.

3.2.5. Autres expériences en cours

- Le CERE 110 : essai de phase 2

L'étude est actuellement en cours de recrutement. L'objectif de cet essai est de démontrer cette fois-ci une amélioration effective des fonctions cognitives chez des patients atteints de MA. Il ne s'agit plus là de montrer l'innocuité du traitement et de définir les doses administrables comme en PHASE 1. Pour cela, il faut donc faire appel à un échantillon plus grand et faire une étude avec placebo. L'expérience se déroulera sur plusieurs sites dont celui de l'Université de San Diego, là où tout a commencé. Un échantillon de cinquante personnes ayant la maladie d'ALZHEIMER d'un stade précoce à modéré sera constitué. La moitié d'entre eux recevra le CERE 110 selon la même procédure qu'en phase 1 (injection dans des conditions stéréotaxiques dans le noyau basal de Meynert) et l'autre moitié recevra le placebo. Les patients seront suivis pendant au moins les deux années suivant l'injection.

Les résultats sont attendus avec une grande impatience, car vu la taille de l'échantillon et l'étude contre placebo, on aura une première véritable idée de la possibilité de faire reculer la maladie et de l'efficacité du traitement **(51)**.

- Essai d'une thérapie génique sur des rats concernant une autre neurotrophine : le NT-4

En Chine, au Kunming Medical College, une équipe de chercheurs s'intéresse à une autre neurotrophine qui pourrait être utilisée tout comme le NGF en thérapie génique dans le traitement pour la maladie d'ALZHEIMER.

L'expérience porte sur des rats chez lesquels on a reproduit une maladie d'ALZHEIMER. On leur injecte au niveau de l'hippocampe des fibroblastes chez lesquels on a transmis le gène NT-4. Les fibroblastes ont permis l'expression de la protéine NT-4 pendant au moins deux mois. Les résultats de l'expérience ont montré une augmentation considérable de l'amélioration des neurones cholinergiques dans la zone de l'hippocampe et

une modification significative du comportement et de la mémoire chez les rats (confirmés par le test du labyrinthe aquatique de Morris). Ceci ouvre des perspectives nouvelles en cas d'échec de la thérapie génique avec le NGF **(52)**.

3.3. Le NGF : présence d'un danger potentiel existant ?

Un certain nombre de chercheurs reste cependant prudent quant à l'utilisation du NGF et rappelle à la communauté scientifique que celui-ci serait peut-être à l'origine de l'activation de l'expression du gène APP et augmenterait les concentrations de peptides A β . Autrement dit, on favoriserait le développement des plaques séniles et donc le processus de la maladie que l'on cherche à éviter. Les études devront donc répondre à cette hypothèse **(53)**.

4. Conclusions sur les possibilités et perspectives

Nous avons pu voir au travers de notre étude sur la maladie d'ALZHEIMER que les possibilités de mise en place de thérapies géniques sont nombreuses. En effet, cette maladie a de nombreuses étiologies géniques possibles (APP, PS1, PS2, apoE4, ...) mais la difficulté réside dans le fait de les identifier et aussi dans le fait que les formes familiales sont peu nombreuses. Et même si l'on parvient à systématiser les diagnostics génétiques, il se posera toujours le problème d'avoir une thérapie génique adaptée au cas concerné. Autrement dit, le seul moyen efficace de ne pas se disperser est de trouver un point commun à tous les cas rencontrés. Et quoi de mieux que de s'attaquer au système compensateur de la maladie. Les seules études en cours s'intéressent aux neurotrophines et plus précisément au NGF en ce qui concerne celles chez l'Homme.

Ainsi donc, les premiers essais se déroulent avec succès au début de ce siècle mais ceux-ci sont à relativiser car les échantillons ne sont pas suffisamment grands pour être significatifs et les études contre placebo viennent seulement d'être lancées. Aucun effet indésirable majeur n'a été rencontré et les résultats de contrôle semblent encourageants quant à l'amélioration des fonctions cognitives. En d'autres termes, les possibilités thérapeutiques de lutte contre la maladie sont belles et bien réelles mais à confirmer.

L'espoir est donc permis mais la prudence reste de mise.

CHAPITRE 3 – LE CANCER BRONCHIQUE A NON PETITES CELLULES (CBNPC)

Nous allons étudier maintenant la dernière phase de notre travail. On se penche ici également sur une maladie qui constitue un phénomène de société car celle-ci est directement liée au tabagisme même si ce n'est pas le seul facteur. En effet, le tabac est réputé pour ses effets néfastes (**figure 19**). De même que pour la MA, nous allons nous intéresser dans un premier temps à l'épidémiologie, la clinique, la physiopathologie, puis on s'attaquera aux gènes d'intérêts qui peuvent présenter une possibilité de thérapie génique en ce qui concerne cette pathologie. Nous verrons ensuite au travers d'une étude le gène qui intéresse les chercheurs aujourd'hui. Enfin, nous concluons sur ce que l'on peut en attendre au vu des résultats.

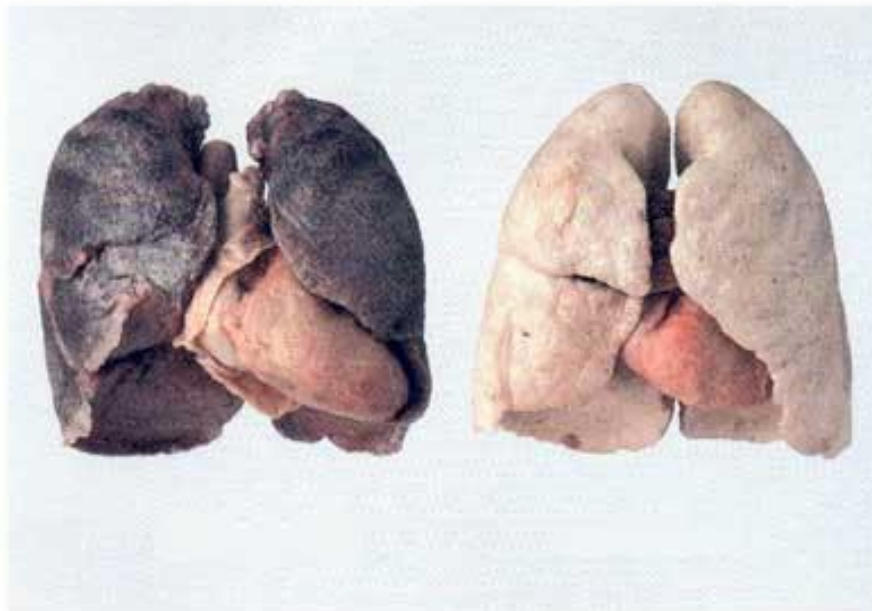


Figure 19 : Observation du poumon chez un fumeur (gauche) et chez un non fumeur (droit)
(54)

1. Présentation et épidémiologie

1.1. Définition

Il s'agit d'une maladie grave et fréquente. Comme dans tous les cancers, on assiste à une prolifération anarchique de cellules. Celles-ci ont bien souvent été soumises à des facteurs « carcinogènes » qui ont eu pour effet de transformer leur matériel génétique et de les convertir en cellules cancéreuses (il s'agit principalement du tabac). Ce qu'il faut bien comprendre avant toute chose, c'est qu'il existe un système bien établi de contrôle de la mitose, non seulement pour la déclencher mais aussi pour la corriger en cas d'erreurs et de prolifération incontrôlée. On se trouve confronté à des cancers lorsqu'il y a mutation non silencieuse des gènes de contrôle de la division et lorsque le système de correction est débordé, ou lorsque les gènes en charge de la correction ont été eux-mêmes mutés. Ces mutations surviennent à la faveur de prédispositions ou lors d'expositions à certains facteurs de l'environnement.

Dans le cancer bronchique, ce sont donc les cellules de l'épithélium des bronches qui sont touchées, on distingue deux grands types de cancers dont celui qui va nous intéresser :

- Le cancer bronchique « à petites cellules » (le plus agressif et le plus dangereux)
- Le cancer bronchique « à non petites cellules » (CBNPC, qui même s'il est moins agressif que celui à petites cellules n'en reste pas moins dangereux) **(55)**

Le cancer bronchique à non petites cellules va donc consister en une prolifération incontrôlée des cellules de la paroi des bronches en un point précis ou en plusieurs points, ce qui aura pour premier effet de comprimer les voies respiratoires (dyspnée, toux,...), de provoquer des hémoptysies (hémorragie des voies aériennes), etc... Puis si le cancer n'est pas pris à temps, il envahit progressivement le système lymphatique (notamment les

ganglions) et les vaisseaux sanguins pour envahir d'autres organes, on dira alors qu'il y a présence de métastases. Arrivé à ce stade le pronostic est très sombre **(55)**.

1.2. Epidémiologie

Il s'agit d'un cancer bien présent dans la population française.

En l'an 2000, d'après les chiffres du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer), on dénombre dans le monde pour tous les types de cancers bronchiques 1 238 861 nouveaux cas dont 1 103 119 décès, ce qui représente une mortalité de **89% !!**

De même en France, on observe une mortalité égale (89%) avec 26 743 nouveaux cas et 25 454 décès. A noter que l'on observe un sex ratio de 6/1 **(tableau 5)** entre hommes (86% des cas) et femmes (14% des cas) **(56)**.

Tableau 5 : Récapitulatif de l'évolution des chiffres de la mortalité en 2000 et en 2010

Année	Nombre de nouveaux cas	Nombre de décès	Mortalité	Sex ratio H/F
2000	26 743	25 454	89%	6/1
2010	36 900	28 800	78%	3/1

Le pronostic global de tous les cancers des poumons est de 10% des malades qui survivent à 5 ans.

Le cancer qui nous intéresse, c'est-à-dire le CBNPC constitue 85% des cas et celui à petites cellules constitue 15% des cas **(56)**.

Le CBNPC se partage en trois grands types histologiques :

- Les carcinomes épidermoïdes (cancer développé à partir d'un tissu épithélial) : 40% des cas.
- Les adénocarcinomes (cancer développé à partir d'un épithélium glandulaire) : 40% des cas également.
- Les carcinomes à grandes cellules : 20% des cas. **(56)**

Ces statistiques montrent donc un phénomène assez ample mais surtout très grave car la mortalité est très élevée et l'espérance de survie est très faible. Une inquiétude qui régnait déjà en 2000 concerne la mise au tabagisme progressive des femmes, les chiffres de 2010 ne font que la confirmer.

Effectivement en 2010, d'après les chiffres de l'InVS (Institut de Veille Sanitaire), on observe chez l'homme 26 900 nouveaux cas avec 21 100 décès contre 10 000 nouveaux cas chez la femme avec 7 700 décès. La mortalité n'est plus que d'environ 78% mais le sex ratio est passé à 3/1 **(tableau 5)** soit 67% de cas chez les hommes et 33% de cas chez les femmes et l'incidence (=nombre de nouveaux cas) ainsi que la mortalité ne cesse d'augmenter chez celles-ci **(57)**.

Tableau 5 : Récapitulatif de l'évolution des chiffres de la mortalité en 2000 et en 2010

Année	Nombre de nouveaux cas	Nombre de décès	Mortalité	Sex ratio H/F
2000	26 743	25 454	89%	6/1
2010	36 900	28 800	78%	3/1

1.3. Classification TNM

La dernière classification TNM (7^{ème} édition) publiée en 2009 permet de classer les cancers broncho-pulmonaires en fonction de l'extension anatomique de ces derniers et de définir un stade de gravité (**figure 20**). Les types histologiques viennent compléter l'évaluation des stades de gravité et permettent l'établissement d'un pronostic.

On la retrouve sur le site « Pneumocancero » de l'institut Bordet (**58**).

Classification TNM 2009 (7^{ème} édition)

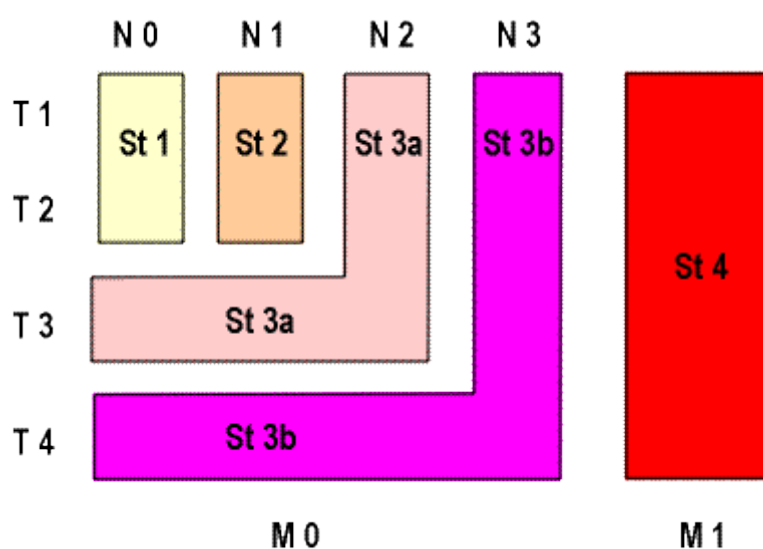


Figure 20 : Regroupement des stades et des TNM (59)

On utilise un T pour évaluer la tumeur primitive, un N pour les ganglions lymphatiques régionaux (node) et un M pour les métastases. Des chiffres y sont associés et représentent des caractéristiques particulières.

T – Tumeur primitive

TX : Tumeur ne pouvant être évaluée ou démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.

T0 : Pas d'évidence de tumeur primitive.

Tis : Carcinome in situ.

T1 : Tumeur de trois cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c'est-à-dire pas la bronche souche).

- T1a : Tumeur de deux cm ou moins dans sa plus grande dimension.
- T1b : Tumeur de plus de deux cm sans dépasser trois cm dans sa plus grande dimension.

T2 : Tumeur de plus de trois cm sans dépasser sept cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes :

- atteinte de la bronche souche à deux cm ou plus de la carène.
 - invasion de la plèvre viscérale.
 - présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre l'ensemble du poumon.
- T2a : Tumeur de plus de trois cm sans dépasser cinq cm dans sa plus grande dimension.
 - T2b: Tumeur de plus de cinq cm sans dépasser sept cm dans sa plus grande dimension.

T3 : il existe cinq possibilités :

- Tumeur de plus de sept cm.
- Tumeur envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleural ou pariétal ou le péricarde.
- Tumeur dans la bronche souche à moins de deux cm de la carène sans l'envahir.
- Tumeur associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier.
- Tumeur avec présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe.

T4 : il existe deux possibilités :

- Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène.
- Tumeur avec présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint.

N – Ganglions lymphatiques régionaux

NX : les ganglions ne peuvent pas être évalués.

N0 : pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale.

N1 : métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct.

N2 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carinaux.

N3 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ou hilaires contralatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou contralatéraux.

M – Métastase à distance

MX : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées.

M0 : absence de métastase à distance.

M1 : métastase à distance.

- M1a : Nodule tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin.
- M1b : métastase à distance.

Le TNM défini lors de l'évaluation d'un cancer pulmonaire permet d'en déduire le stade de gravité (**tableau 6**). De ce stade de gravité dépend l'espérance de survie que l'on donne au patient. Il est toujours difficile de prédire une durée exacte mais une chose est sûr, lorsque le CBNPC s'est métastasé, le patient ne peut espérer vivre que quelques mois (**58**).

Tableau 6 : Stades de gravité définis par la TNM au cours de cancers broncho-pulmonaires (58)

Cancer occulte	TX	N0	M0
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1a, b	N0	M0
Stade IB	T2a	N0	M0
Stage IIA	T1a, b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stade IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stade IIIB	T4	N2	M
	Tout T	N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

2. Physiopathologie

Avant toute chose, il est nécessaire de posséder quelques notions d'anatomie et de physiologie, nous nous attaquerons ensuite aux causes de la maladie et leurs impacts.

2.1. Généralités

2.1.1. Anatomie

Les poumons au nombre de deux se situent dans le thorax (**figure 21**), de chaque côté du cœur. Ils ne sont pas tout à fait identiques, c'est-à-dire que d'un côté du cœur (le droit) il se compose de trois lobes et de l'autre côté (le gauche), il est constitué par deux lobes. Ces lobes sont séparés par des cloisons appelées scissures (**60**).



Figure 21 : Place des poumons dans le système respiratoire (**60**)

De la trachée partent les bronches qui se trouvent à l'intérieur des lobes. Celles-ci se divisent ensuite en bronchioles qui débouchent sur des sacs alvéolaires contenant des alvéoles (on y trouve un réseau capillaire permettant les échanges gazeux). Une double enveloppe permet de maintenir les poumons contre la cage thoracique, il s'agit de la plèvre. Entre ceux-ci et au dessus du cœur se trouve le médiastin qui s'étend du sternum à la colonne vertébrale. L'œsophage, la trachée et l'aorte passent par celui-ci. On y retrouve aussi les ganglions lymphatiques médiastinaux derrière le sternum **(figure 22)**. Ce système peut d'ailleurs souvent être envahi par des cellules cancéreuses à la suite d'un cancer bronchique quel qu'il soit.

Etant donné la vascularisation qui règne dans les poumons et la présence du système lymphatique, et vu le contact étroit qui y règne, les cellules cancéreuses peuvent se propager très facilement et dans tout l'organisme **(60)**.

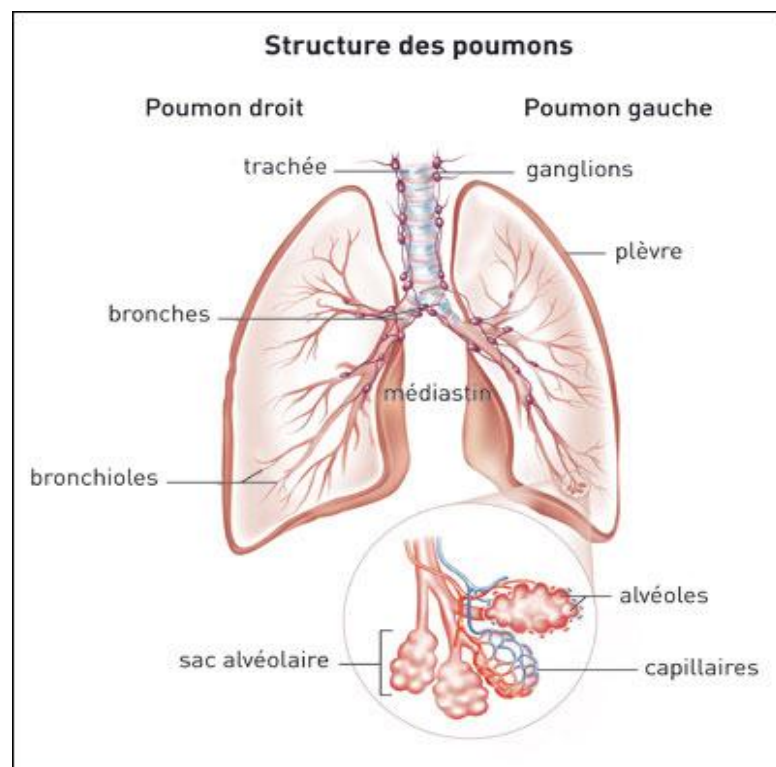


Figure 22 : Structure des poumons (60)

2.1.2. Physiologie

Le rôle des poumons consiste principalement à fournir l'organisme en oxygène et à évacuer le dioxyde de carbone. Ils possèdent également un faible rôle de métabolisation et d'élimination pour certaines substances.

Lors d'une inspiration, l'oxygène dans l'air est conduit par la trachée jusqu'aux bronches, puis passe par les bronchioles et arrive dans les alvéoles. A partir de là, il passe dans le sang grâce aux capillaires présents et à un gradient de concentration résultant de la différence de pression entre les alvéoles et le sang. Puis il est distribué dans l'ensemble de l'organisme.

Lors d'une expiration, le dioxyde de carbone passe du sang aux alvéoles par le même mécanisme que l'oxygène, donc grâce à un gradient de concentration. Puis il effectue le chemin inverse par rapport à l'oxygène **(60)**.

2.2. Etiologies et conséquences cliniques

2.2.1. Etiologies et facteurs de risques

Si plusieurs facteurs sont impliqués, le principal incriminé est le tabac. En effet, entre 80 et 90% des cancers du poumon sont dus au tabagisme. Des centaines de travaux ont confirmé son rôle pathogène. Près de 4 000 éléments sont contenus dans le tabac et une soixantaine d'entre eux sont reconnus comme cancérogènes pour l'Homme. Les plus puissants d'entre eux sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui forment des adduits sur l'ADN et provoquent des mutations de gènes intervenants sur la division **(61) (62)**.

On peut voir sur la **figure 23** une liste de substances dangereuses contenues dans celui-ci, que ce soit au niveau cardiovasculaire ou cancérogène.

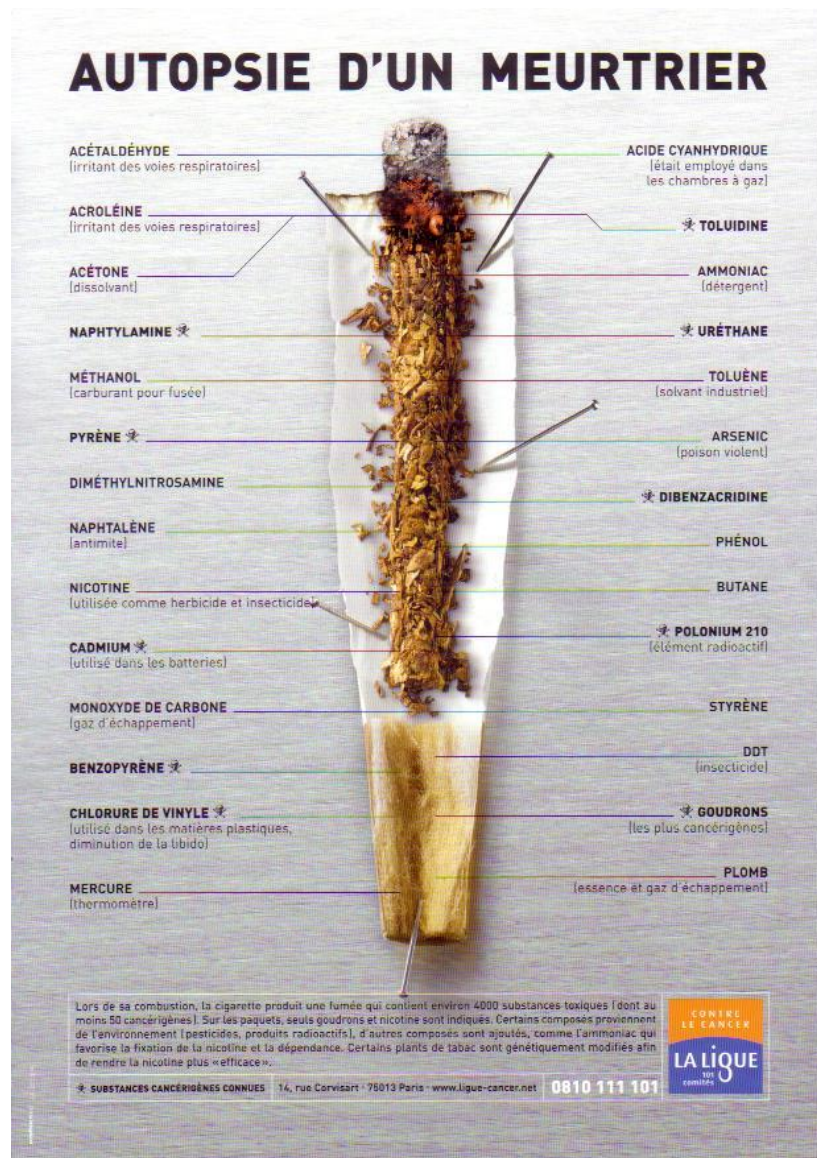


Figure 23 : Différentes substances dangereuses retrouvées dans la fumée du tabac (64)

On regroupe donc à l'heure actuelle trois grandes causes :

- Le tabac.
- L'exposition à la fumée secondaire (tabagisme passif).
- Les particules cancérigènes passant principalement par les voies respiratoires (amiante, arsenic, radon, ozone,...) **(61) (62)**

Il ne faut cependant pas oublier qu'il existe également des facteurs de risques et des pathologies préexistantes qui augmentent le risque de développer un cancer. On peut y lister les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et plus généralement toutes les maladies fibrosantes. La personne alors atteinte développera plus souvent dans ces cas là un adénocarcinome.

On sait également que les radiations ionisantes naturelles, la pollution atmosphérique, et les antécédents familiaux de cas de cancers constituent des facteurs de risques non négligeables **(61) (62)**.

2.2.2. Les gènes incriminés

- Les preuves de l'implication de la génétique

Deux médecins américains ont clairement montré dans les années 1960 que des cas familiaux de cancers des poumons existent. D'autres études l'ont démontrées, on sait aujourd'hui que tout fumeur ayant au moins trois personnes atteintes de tumeurs pulmonaires a trois fois plus de risques de développer un cancer et que pour quatre atteintes, il y a quatre fois plus de risques par rapport à un fumeur sans antécédents. On observe également que des non fumeurs ont développé des cancers pulmonaires et que de très gros fumeurs n'en ont jamais développé, ce qui est effectivement plutôt en la faveur du fait qu'il existe une prédisposition génétique. Ce n'est pas pour

autant que l'on minimisera le fait de fumer, les autres conséquences du tabac pouvant être désastreuses notamment au niveau cardiovasculaire **(64)**.

- Le gène de susceptibilité : la région RGS17

Le Docteur Marshall ANDERSON et son équipe viennent d'identifier un gène qui serait responsable de déclenchement de cancers bronchiques même chez les fumeurs qui fument peu. Il se situe sur le chromosome 6 au niveau du locus 6q23-25 dans la région RGS17. L'intérêt d'identifier de tels gènes serait de détecter les personnes à risque et de pouvoir intervenir très tôt dans la prise en charge de celles-ci **(65)**.

- Le gène p53

Ce gène connu depuis un moment maintenant, est un gène « suppresseur de tumeur ». Il permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, phase au cours de laquelle la cellule s'accroît et est le siège d'une intense synthèse protéique. Durant celle-ci, la cellule synthétise des facteurs mitogènes.

Il permet également l'activation de l'apoptose.

On comprend bien alors que si celui-ci est muté et n'exécute plus ses fonctions, la cellule devient maligne. C'est ce qui se passe dans la plupart des cancers bronchiques avec tous les types histologiques confondus. On note que 70% des cancers bronchiques sont dus à une altération du gène p53. Les mutations de ce gène sont induites notamment par le tabac **(66)**.

2.2.3. Symptomatologie

La maladie peut parfois rester silencieuse pendant longtemps. Ainsi donc la plupart des cas sont diagnostiqués tard, entre 40 et 75 ans, à la faveur de symptômes qui apparaissent parfois bénins mais dont la persistance ou la répétition localisée amène à se poser la question sur la possibilité d'un cancer.

On retrouve souvent la liste de symptômes suivante :

- Toux persistante, plus ou moins quinteuse
- Infections pulmonaires à répétitions et localisées au même endroit
- Des douleurs thoraciques
- Dyspnée
- Dysphonie
- Dysphagie
- Perte de poids
- Hypoxie
- Asthénie
- Hémoptysie
- Hyperthermie
- Adénopathie axillaire
- Douleurs osseuses
- Divers syndromes dont le syndrome paranéoplasique : ils sont constitués par des symptômes qui n'ont a priori rien à voir avec la tumeur cancéreuse. Il s'agit de signes qui se retrouvent à distance de celle-ci car la tumeur peut avoir une action systémique par la production de substances diverses. **(62)**

On constate que beaucoup de symptômes sont peu spécifiques, ce qui rend la suspicion de la maladie peu évidente.

3. La stratégie d'attaque en thérapie génique et les techniques utilisées

3.1. Le gène p53 : cible de la thérapie génique contre le CBNPC

On connaît à l'heure actuelle deux gènes impliqués dans le déclenchement de cancers pulmonaires dont les CBNPC.

Il s'agit du gène de susceptibilité de la région RGS17 mis à jour récemment et de la mutation du gène p53 rendu ainsi non fonctionnel.

Pour le moment, seul le gène p53 fait l'objet d'études sur le CBNPC. On va donc s'intéresser à une étude de phase 1 menée ces derniers temps sur celui-ci faisant appel à un vecteur viral. Une autre étude, utilisant le même vecteur est en cours mais celle-ci additionne une radiothérapie à la thérapie génique, nous ne l'aborderons pas ici car les résultats n'ont pas encore été publiés **(67)**.

3.2. Etude menée par le NCI (National Cancer Institute)

- Présentation

Cette étude menée par le Docteur David P. CARBONE et son équipe au VANDERBILT-INGRAM CANCER CENTER vise à mettre en évidence l'innocuité du traitement pour l'Homme, trouver la dose limite de toxicité et à observer si a priori il aurait un impact bénéfique sur des malades atteints de CBNPC. Sponsorisée par le Eastern Cooperative Oncology Group, en collaboration avec le NCI, l'équipe de recherche mène donc un essai de phase 1 concernant un procédé de thérapie génique par vecteur viral introduit par lavage bronchoalvéolaire. L'expérience se débute le 1^{er} Novembre 1999 et se termine le 6 Février 2009 **(67)**.

- Protocole

Il consiste à transférer le gène p53 fonctionnel (**figure 24**) à des patients par l'intermédiaire d'un adénovirus (Ad5CMV-gene) en utilisant une technique IN SITU : le lavage bronchoalvéolaire ; on injecte donc directement le traitement contenant les vecteurs dans les bronches. Pour comprendre le choix de ce vecteur, il suffit de se reporter au **tableau 2** dans le premier chapitre « Généralités ».

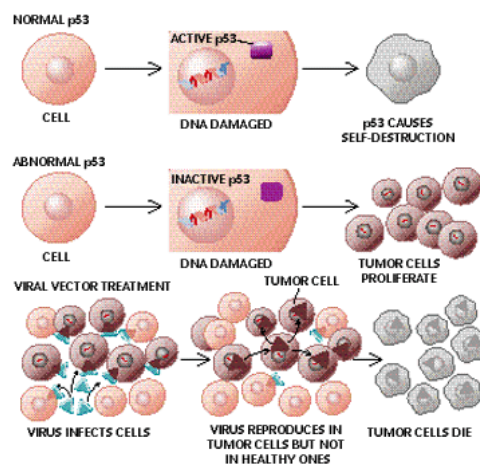


Figure 24 : Illustration du principe de la thérapie génique par le gène p53 et son vecteur viral (68)

Les injections ne se feront au départ que dans un seul lobe. En cas de réponse positive, d'autres lobes pourront être traités.

Trois cohortes de trois patients chacune vont subir des tests pour évaluer la dose toxique limite (DLT : dose limiting toxicity). Tout d'abord, on réalise des biopsies du lobe à traiter puis on donne le traitement à une dose de 2.10^9 vp aux jours 1 et 15 puis on effectue des biopsies aux jours 3 et 28 pour évaluer les effets. Si les effets observés sont bénéfiques au niveau clinique et qu'aucun effet indésirable ne s'est manifesté, on procède à une augmentation de la dose. Lorsque l'un des patients présente des effets toxiques, on introduit deux patients de plus dans la cohorte à la même dose. Si plus d'un patient sur cinq montre des effets indésirables à cette dose, on délimite alors la DLT. On prend alors la dose qui précède la DLT comme la dose maximum tolérée : MDT (Maximum tolerated dose). Dix patients sont ajoutés dans l'essai à la MDT.

Les patients seront alors suivis tous les trois mois pendant deux ans, puis tous les six mois pendant trois ans, puis annuellement **(67)**.

- L'échantillon

Il se compose de vingt-cinq personnes au total. Neuf patients sont présents au tout début de l'expérience puis d'autres s'ajouteront au fur et à mesure de l'essai **(67) (69)**.

- Les critères d'acceptabilité

- Age : 18 ans ou plus
- Les patients doivent être déclarés inopérables et le modèle de croissance doit permettre l'accès du traitement aux cellules tumorales par lavage bronchoalvéolaire.
- Limite d'espérance de vie : 12 semaines
- Fonction hépatique : bilirubine < 1.5 mg/dL
- Fonction rénale : créatinine < 1.5 mg/dL
- Pas de problèmes cardiovasculaires majeurs
- Autres : pas d'infections virales ou autres actives, VIH négatif, pas de femmes enceintes,... **(67)**

- Résultats et conclusion

La DLT déduite de l'essai se situe à 2.10^{12} vp. La MDT définie se situe à 5.10^{11} vp. Il s'agit de la dose que l'on utilisera dans l'essai de phase 2.

Les effets indésirables observés sont les suivants :

- Hypoxie
- Dyspnée
- Fièvres basses

Aussi on observe les résultats présents :

- Un patient a stabilisé son état mais présente des effets toxiques graves.
- Un patient est mort.
- Les dix patients traités à la MDT ne présentent aucun effet indésirable.
- Seize patients ont stabilisé leur état.
- Huit patients ont vu leur maladie s'améliorer.

Ainsi donc, les chercheurs ont déduit logiquement de ces résultats que l'adénovirus p53 peut être administré à l'Homme par lavage bronchoalvéolaire sans risques, à une MDT de 5.10^{11} vp, et qu'il semble présenter un intérêt réel dans le traitement du CBNPC et qu'il nécessite des essais de phase 2 **(69)**.

4. Conclusions sur les possibilités et perspectives

L'annonce à un patient qu'il souffre d'un cancer bronchique quel qu'en soit le stade n'est jamais un bon pronostic. Les cancers pulmonaires figurent parmi les plus dangereux et leur diagnostic ressemble en quelque sorte à une condamnation à mort. Les traitements élaborés pour le moment (chimiothérapie, radiothérapie et chirurgie) ne semblent guère apporter de vrais résultats avec une mortalité qui reste très élevée (78%) et une survie de 10% à 5 ans.

Plusieurs types de tumeurs existent, les CBNPC en constituent près de 85% et certaines dites inopérables annoncent inexorablement la fin. Ces cancers, même soignés, ne permettent pas à la vie d'être prolongée très longtemps, et le coût de prise en charge n'est pas négligeable. C'est là qu'intervient la thérapie génique. Comme vu précédemment dans notre première partie « Généralités », sur le papier, cela est tout à fait prodigieux, mais il reste néanmoins à parvenir à la mettre en pratique. C'est ce que le professeur David P. CARBONE et son équipe ont essayé de réaliser dans cet essai de phase 1 à l'aide d'un adénovirus (**figure 25**). Et il ressort de ces résultats que le traitement est très satisfaisant.

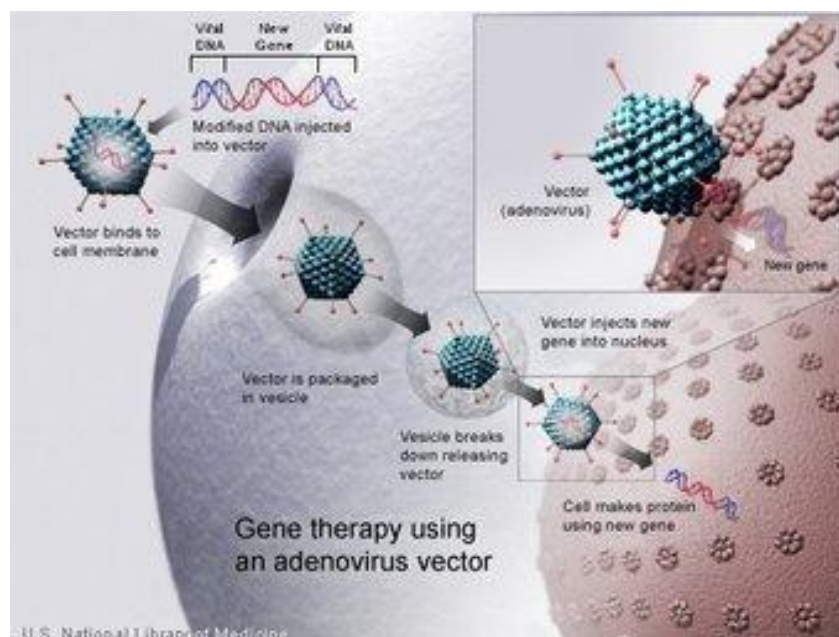


Figure 25 : Illustration d'une thérapie génique utilisant un adénovirus (70)

En effet, chez vingt-cinq personnes traitées, une seule est morte, seize ont vu leur maladie stabilisée et huit ont vu leur maladie s'améliorer! Mais la plus grande satisfaction réside dans le fait que ces gens devaient requérir des critères très sombre pour pouvoir être inclus dans l'essai : le CBNPC devait être inopérable et laisser une survie de douze semaines. Autrement dit, ces patients étaient condamnés et n'avaient plus que pour traitement des soins palliatifs (chimiothérapie palliative, antalgiques morphiniques, oxygénothérapie,...) et là, vingt-quatre patients ont survécu jusqu'à la fin de l'essai, soit pendant presque dix ans!!! Autrement dit, même si des effets indésirables venaient à se manifester suite à des insertions génotoxiques, l'effet aura été plus que bénéfique surtout pour les malades dont l'état s'est amélioré. Il faudrait cependant le réserver à des malades gravement atteints comme ceux qui ont servi à l'étude. Il est encore un peu tôt quant à se prononcer pour des indications précises du traitement. L'étude de phase 2 doit être lancée pour se faire une meilleure idée mais ces premiers résultats sont très encourageants. Qui plus est, comme nous l'avons précisé auparavant, 70% des cancers bronchiques sont dus au gène p53 (au moins en partie, car les cancers sont souvent d'origine multifactorielle). Ce qui permettrait d'envisager de guérir une très grande partie de ceux-ci.

Pour conclure donc, on peut affirmer que le traitement par thérapie génique du CBNPC est un réel succès. Les espoirs sont immenses à juste titre concernant cette maladie et il est très fortement probable que la thérapie génique par le gène p53 constitue un traitement du CBNPC à terme, en avançant toujours avec précautions cela dit, comme pour n'importe quel médicament à l'essai.

CONCLUSION

Nous arrivons au terme de notre travail et nous pouvons ainsi évaluer où en sont les connaissances actuelles en thérapie génique et ce qu'elles laissent entrevoir en ce début de XXI^{ème} siècle, et tout particulièrement sur la MA et le CBNPC.

Nous avons abordés dans un premier temps les moyens biotechnologiques à la disposition des thérapies géniques dans le chapitre « Généralités ».

Nous avons pu, au cours de cette première partie, mettre en évidence qu'il faut utiliser des vecteurs (viraux ou non viraux) dont la conception se fait par des biotechnologies fondamentales. La vectorologie relève d'un domaine complexe car elle fait appel principalement à des virus et beaucoup de mystères entourent encore leur fabrication (pour les améliorer), et leur utilisation (pour diminuer les effets indésirables). Il est préférable, d'après les connaissances actuelles, d'utiliser des vecteurs viraux (trois principalement : les adénovirus, les rétrovirus et les AAV). En effet le coût de fabrication étant plus cher certes, la production plus délicate, les effets indésirables plus nombreux et les gènes insérés moins grands que les vecteurs non viraux, la capacité de pénétration dans les cellules et leur grande efficacité dans le transfert du gène en font des vecteurs de choix pour les thérapies géniques contrairement aux autres.

Nous avons pu également voir que depuis les prémices, peu de succès semblent avoir eut lieu. Pourtant il en existe bel et bien à l'Hôpital Necker de Paris en 2007 pour un cas de beta-thalassémie chez un jeune homme de dix-huit ans par exemple. Bien souvent, l'échec d'une thérapie génique relève de la survenue d'effets indésirables tels que des leucémies (en 2000 à l'hôpital Necker-Enfants Malades de Paris avec les enfants bulles), ou des encéphalites. Mais on sait cependant que les connaissances de la génétique

et des vecteurs étant à approfondir, notamment concernant l'insertion des gènes, on peut se dire qu'il y a matière à espérer et à attendre beaucoup de ce type de thérapie.

Dans un deuxième chapitre sur la MA, nous avons pu mettre en évidence que de très récents succès viennent s'y ajouter.

Effectivement, l'étude de phase 1 du Docteur TUSZYNSKI sur le NGF (neurotrophine) en utilisant une thérapie en mode EX VIVO (prélèvement de fibroblastes soumis à des rétrovirus), se révèle certes défectueuse sur le plan opératoire avec deux patients atteints d'hémorragies cérébrales sur huit testés (dont l'un est mort), mais les résultats quant à l'action du traitement sont très intéressants. On a observé une réduction significative du déclin cognitif, une augmentation du métabolisme des neurones cholinergiques et on retrouve chez quatre des sujets une croissance des neurones. Ceci dit, il faut rester prudent et attendre des confirmations par l'essai de phase 2.

Le CERE 110, traitement en mode IN VIVO à l'aide d'AAV et qui se trouve pour l'heure aux essais de phase 2, a vu en phase 1 des résultats similaires à ceux du premier essai clinique EX VIVO. Cela dit, l'échantillon de six personnes ne présente aucun effet indésirable. Aucune victime n'est à déplorer.

Ces deux études sont donc plutôt encourageantes et peuvent être considérées comme des succès. Il faut rester prudent cela dit, les échantillons étant faibles et l'étude contre placebo n'ayant pas eu lieu.

D'autres pistes sont à l'étude, notamment l'utilisation de NT-4 (autre neurotrophine que le NGF) sur des souris par des chercheurs chinois au Kunming Medical College. Les résultats semblent encourageants mais il s'agit d'un test sur des animaux, donc imprévisible pour le moment chez l'Homme.

Dans notre dernier chapitre, nous nous sommes intéressés au CBNPC et là aussi les résultats sont intéressants, voir très bons.

L'étude de phase 1 sur le gène p53 par le professeur David P. CARBONE et son équipe se voit très prometteuse. On peut parler de réel succès. L'utilisation d'un adénovirus en mode IN SITU (lavage bronchoalvéolaire) a donné de très bons résultats. Seize patients sur vingt-cinq testés ont vu leur état de maladie stabilisé, huit autres l'ont vu s'améliorer et un seul est mort. Ces malades ont vu leur espérance de survie passer de douze semaines à presque dix années (durée de l'étude). L'amélioration observée laisse même espérer que l'on puisse « guérir » un jour ce cancer qui condamne à la mort dans la plupart des cas.

Une autre étude utilisant le même procédé et additionnant une radiothérapie est en cours. Les résultats sont attendus avec impatience.

On pourra donc affirmer que la thérapie génique dans le traitement du CBNPC est un réel succès.

D'une manière plus générale, on pourra conclure que le progrès est bel et bien présent, que nous avons quitté le domaine de la science-fiction, et que nous sommes à l'aube du plein essor des thérapies géniques.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Un gène est un fragment d'ADN.....	8
Figure 2 - Transfert d'un gène médicament.....	11
Figure 3 - Louis PASTEUR.....	16
Figure 4 - Formule générale d'une pénicilline.....	18
Figure 5 - Nombre d'essais cliniques approuvés en fonction des années.....	20
Figure 6 - Mode ex vivo.....	23
Figure 7 - Structure d'un rétrovirus.....	25
Figure 8 - Structure d'un adénovirus.....	25
Figure 9 - Structure d'un vecteur viral.....	27
Figure 10 - Découpage par des endonucléases spécifiques.....	27
Figure 11 - Collage par une ligase spécifique.....	28
Figure 12 - Principe de production d'un vecteur viral.....	29
Figure 13 - Alois ALZHEIMER.....	40
Figure 14 - Observation au microscope optique par immunohistochimie d'une coupe de tissu nerveux chez un patient atteint d'ALZHEIMER. Les flèches vertes indiquent les dépôts de peptides β amiloïdes (amas bruns).....	43
Figure 15 - Clivages du gène APP.....	44
Figure 16 - Comparaison de la protéine Tau normale et de la protéine Tau pathologique entraînant le processus de la DNF.....	47
Figure 17 - Comparaison à l'IRM d'un cerveau normal et d'un cerveau atteint par la Maladie d'ALZHEIMER à un stade tardif.....	53
Figure 18 - Evolution corticale progressive des atrophies observées.....	54

Figure 19 - Observation du poumon chez un fumeur (gauche) et chez un non fumeur (droit).....	67
Figure 20 - Regroupement des stades et des TNM.....	71
Figure 21 - Place des poumons dans le système respiratoire.....	75
Figure 22 - Structure des poumons.....	76
Figure 23 - Différentes substances dangereuses retrouvées dans la fumée du tabac.....	78
Figure 24 - Illustration du principe de la thérapie génique par le gène p53 et son vecteur viral.....	83
Figure 25 - Illustration d'une thérapie génique utilisant un adénovirus.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Projets de thérapies géniques (environ 300) déposées en 2000 auprès des autorités américaines ou européennes.....	21
Tableau 2 - Caractéristiques des différents vecteurs viraux.....	30-31
Tableau 3 - Récepteurs des neurotrophines (les grandes croix en gras indiquent les récepteurs avec la plus grande affinité, les petites ceux pour lesquels l'affinité est faible).....	57
Tableau 4 - Avantages et inconvénients de l'essai clinique de phase.....	61
Tableau 5 - Récapitulatif de l'évolution des chiffres de la mortalité en 2000 et en 2010.....	69-70
Tableau 6 - Stades de gravité définis par la TNM au cours de cancers broncho-pulmonaires.....	74

BIBLIOGRAPHIE

- (1) <http://www.genethique.org>, « Thérapie génique », consulté le 8 janvier 2011.
- (2) <http://www.ethique.inserm.fr>, SERGENT J-A, « Thérapie génique : historique et législation », 2004, consulté le 8 janvier 2011.
- (3) <http://www.techno-science.net>
- (4) <http://www.genethique.org>, « La thérapie génique qu'est-ce que c'est ? Comment ça marche ? », consulté le 12 janvier 2011.
- (5) <http://www.er.uqam.ca>, consulté le 12 janvier 2011.
- (6) <http://www.reflexiences.com>, NICOLLE J, « Les deux grandes formes de thérapie génique : germinale et somatique », consulté le 12 janvier 2011.
- (7) SWYNGHEDAUW B, SILVESTRE J-S, « Biologie et génétique moléculaires : aide-mémoire », Paris, Dunod, DL 2008, troisième édition, p105 et p120, consulté le 13 janvier 2011.
- (8) <http://www.fondation-alzheimer.org>, « GWAS », consulté le 28 janvier 2011.
- (9) <http://www.techno-science.net>, « Biotechnologie », consulté le 2 février 2011.
- (10) <http://www.crdp-strasbourg.fr>, « Les biotechnologies » p7-20 (2. Le développement des biotechnologies : quelques repères historiques), consulté le 10 février 2011.

- (11) <http://fr.academic.ru>, consulté le 10 février 2011.
- (12) <http://commons.wikimedia.org>, consulté le 10 février 2011.
- (13) GILGENKRANTZ S, « MEDECINE/SCIENCES » 2007 ; 23 : 221-2 à propos du livre « Thérapie génique : espoir ou illusion ? », JORDAN B, consulté le 25 février 2011.
- (14) <http://www.mon-genome.com>, consulté le 26 février 2011.
- (15) MAMMETTE A, « Virologie médicale », collection Azay, presses universitaires de lyon 2002, tableau p235, consulté le 2 mars 2011.
- (16) FEINGOLD J, FELLOUS M, SOLIGNAC M, « Principes de génétique humaine », Paris, Hermann, 1998, consulté le 2 mars 2011.
- (17) NICOLLE J, <http://www.reflexiencies.com>, « Les modes de traitements », consulté le 5 mars 2011.
- (18) <http://www.universalis.fr>, « Ce que doit être un vecteur », consulté le 5 mars 2011.
- (19) <http://www.chups.jussieu.fr>, consulté le 6 mars 2011.
- (20) <http://www.public-health.uiowa.edu>, consulté le 6 mars 2011.
- (21) ETIENNE J, CLAUSER E, HOUSSET E, ROINGEARD E, « Biochimie génétique, Biologie moléculaire », Masson, neuvième édition, consulté le 10 mars 2011.
- (22) <http://www.afm-telathon.fr>, « Cinq étapes pour fabriquer un vecteur », consulté le 2 mars 2011.

- (23) <http://www.afm-téléthon.fr>, DUPUY-MAURY F, GRIFFITH G, « Le point sur la construction d'un vecteur viral contenant un gène thérapeutique », consulté le 16 mars 2011.
- (24) <http://www.unilim.fr>, consulté le 16 mars 2011.
- (25) Docteur COULON J, définition extraite du cours d'UV13 intitulé « Bioréacteurs et fermentation », consulté le 17 mars 2011.
- (26) <http://agora.qc.ca>, « Thérapie génique », consulté le 30 mars 2011.
- (27) Docteur NAMY O, <http://www.futura-sciences.com>, « Thérapie génique : les raisons d'un échec », consulté le 2 avril 2011.
- (28) <http://www.pourlascience.fr>, PERRIER J-J, « Bêta-thalassémie : une première de thérapie génique à confirmer », consulté le 7 avril 2011.
- (29) SELMES J, DEROUESNE C, « La maladie d'Alzheimer », Paris, first éd, DL 2009, consulté le 12 avril 2011.
- (30) www.gloriajean.org, "About Alzheimer's", consulté le 12 avril 2011.
- (31) <http://sante-medecine.commentcamarche.net>, HORDE P, « Maladie d'Alzheimer », consulté le 13 avril 2011.
- (32) <http://acces.inrp.fr>, consulté le 16 avril 2011.
- (33) <http://www.alzheimer-adna.com>, « Schéma sur les mécanismes pathologiques », consulté le 16 avril.
- (34) SCHENK, LEUBA, BULA, « Du vieillissement cérébral à la maladie d'Alzheimer, notion de plasticité », De boeck, collection Neurosciences et cognition, consulté le 18 avril.

- (35) <http://www.francealzheimer.org>, « La recherche », consulté le 20 avril 2011.
- (36) <http://www1.tu-darmstadt.de>, consulté le 20 avril 2011.
- (37) <http://encyclo.voila.fr>, consulté le 21 avril.
- (38) <http://www.caducee.net>, « Alzheimer : un dysfonctionnement dans la clairance du peptide bêta-amyloïde ? », informations extraites de Journal of Clinical Investigation 2000 ; 106(12) : 1489-99, consulté le 15 juillet 2011.
- (39) MICAS M, « Alzheimer : prévention, causes et symptômes au quotidien, conseils pratiques », Paris, Josette Lyon, DL2009, deuxième édition mise à jour, consulté le 25 avril 2011.
- (40) <http://www.mypharma-editions.com>, « Alzheimer : Eli Lilly annonce l'arrêt du développement du Semagacestat », informations extraites d'un communiqué Lilly et AFP, consulté le 21 juillet 2011.
- (41) TOUCHON J, PORTET F, « La maladie d'Alzheimer », Masson, Paris, 2002, consulté le 30 juillet 2011.
- (42) <http://www.tpeirm2010.e-monsite.com>, consulté le 30 juillet 2011.
- (43) <http://www.passeportsante.net>, « Maladie d'Alzheimer », consulté le 6 août 2011.
- (44) <http://www.lecerveau.mcgill.ca>, consulté le 30 juillet 2011.
- (45) BEAULIEU P, « Pharmacologie de la douleur », Les presses de l'Université de Montréal, consulté le 10 août 2011.

- (46) <http://clinicaltrials.gov>, « Gene Therapy for Alzheimer's Disease Clinical Trial », description d'une étude menée par le Dr TUSZYNSKI M, sponsorisée par The Shiley Family Trust, l'ISOA (Institute for the Study on aging), et l'Université de Californie à San Diego, consulté le 12 août 2011.
- (47) <http://tuszynskilab.ucsd.edu/gt.php>, « Gene Therapy for Alzheimer's Disease - Clinical Trial Updates – update January 25, 2008 », consulté le 12 août 2011.
- (48) <http://www.futura-sciences.com>, « Tentative de thérapie contre la Maladie d'Alzheimer : étape importante », consulté le 12 août 2011.
- (49) <http://clinicaltrials.gov>, « CERE-110 in subjects with mild to moderate Alzheimer's Disease », description d'une étude menée par SIFFERT J, sponsorisée par Ceregene, consulté le 15 août 2011.
- (50) <http://www.medicalnewstoday.com>, “Ceregene presents interim phase 1 clinical data of CERE-110 for the treatment of Alzheimer’s disease”, consulté le 16 août 2011.
- (51) <http://clinicaltrials.gov>, « Randomized, Controlled Study Evaluating CERE-110 in Subjects With Mild to Moderate Alzheimer's Disease » description d'une étude menée par AISEN P, sponsorisée par Ceregene, consulté le 18 août 2011.
- (52) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, “Effects of NT-4 gene modified fibroblasts transplanted into AD rats”, article concernant une étude menée par Liu J, Zhang Z, Li JT, Zhu YH, Zhou HL, Liu S, Wang TH, sponsorisée par Institute of Neuroscience, Kunming Medical College, consulté le 20 août 2011.
- (53) <http://www.faqs.org>, MARX J, « NGF and Alzheimer : hopes and fears », consulté le 26 août 2011.
- (54) <http://sophette1.files.wordpress.com>, consulté le 15 septembre 2011.

- (55) <http://www.lecancer.fr>, « Cancer du poumon : définition », consulté le 16 septembre 2011.
- (56) <http://www.chups.jussieu.fr>, GATINEAU M, CHARLOTTE F, JAUFFRET E, RIQUET M, BAILLET F, « Partie II – Localisations ; chapitre 13 – Cancers bronchiques à non petites cellules », consulté le 22 septembre 2011.
- (57) <http://www.invs.sante.fr>, « Les chiffres 2010 du cancer disponible sur le site de l'InVS », consulté le 23 septembre 2011.
- (58) <http://www.pneumocancero.com>, « Classification TNM 2009 (7^{ème} édition) », consulté le 25 septembre 2011.
- (59) <http://www.oncoprof.net>, consulté le 25 septembre 2011.
- (60) <http://www.e-cancer.fr>, « Les poumons », consulté le 2 octobre 2011.
- (61) <http://www.passeportsante.net>, « Cancer du poumon », consulté le 7 octobre 2011.
- (62) DENOTTE M, « L'utilisation de la thérapie ciblée dans les cancers bronchiques », T/PH/N/2009/36, consulté le 8 octobre 2011, disponible à la bibliothèque universitaire de Pharmacie-odontologie de Nancy.
- (63) <http://gohb.fr>, consulté le 8 octobre 2011.
- (64) <http://sante.lefigaro.fr>, PEREZ M, « Cancer du poumon : un gène prédisposant », consulté le 10 octobre 2011.
- (65) <http://www.eh.uc.edu>, « Family lung cancer study », conclusions d'une étude du Dr. ANDERSON (University of Cincinnati College of Medicine), consulté le 15 octobre 2011.

- (66) <http://cat.inist.fr> BRAMBILLA E., BRAMBILLA C., cat.inist.fr, « p53 and lung cancer », extrait de la revue "Pathologie et biologie" 1997, vol. 45, n° 10, pp. 777-908 (115 ref.), pp. 852-863, consulté le 17 octobre 2011.
- (67) <http://clinicaltrials.gov>, « Gene therapy in treating patients with non-small cell lung cancer that cannot be surgically removed », description d'une étude menée par CARBONE DP, sponsorisée par Eastern cooperative oncology group et le NCI, consulté le 25 octobre 2011.
- (68) <http://mudunekade.blogspot.com>, consulté le 2 novembre 2011.
- (69) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, "Phase 1 study of adenovirus p53 administered by bronchoalveolar lavage in patients with bronchioloalveolar cell lung carcinoma : ECOG 6597", résultats d'une étude menée par Keedy V, Wang W, Schiller J, Chada S, Slovis B, Coffee K, Worrell J, Thet LA, Johnson DH, Carbone DP, sponsorisée par le Eastern cooperative oncology group et le NCI, consulté le 12 novembre 2011.
- (70) <http://www.univ-rouen.fr>, consulté le 18 novembre 2011.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 14 Février 2012

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Stéphane LAFONTAINE

Sujet : Perspectives des thérapies géniques en 2012 : une analyse
au travers des biotechnologies employées, de la Maladie
d'ALZHEIMER et du cancer bronchique à non petites cellules

Jury :

Président : M. Bertrand RIHN, Professeur à la faculté de
Pharmacie de NANCY

Directeur : M. Joël COULON, MCU à la faculté de Pharmacie
de NANCY

Juges :

- M. Jean-Louis MERLIN, Professeur à la faculté de
Pharmacie de NANCY

- M. Thomas MESNARD, Pharmacien d'officine à Sérémaange
- Mme Isabelle BERTRAND, MCU à la faculté de Pharmacie
de NANCY

Vu,

Nancy, le

13-01-12

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

Professeur B. RIHN
Nancy - Université

M. RIHN



M. COULON

Vu et approuvé,

Nancy, le 16.01.12

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,


Francine PAULUS
FACULTE de PHARMACIE

Vu,

Nancy, le 17.01.2012

~~Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,~~
L'administrateur Provisoire
de l'UDC.


Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement :

3875-

N° d'identification :

TITRE

**PERSPECTIVES DES THERAPIES GENIQUES EN 2012 :
UNE ANALYSE AU TRAVERS DES BIOTECHNOLOGIES, DE
LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DU CANCER
BRONCHIQUE A NON PETITES CELLULES**

Thèse soutenue le 14 février 2012

Par Stéphane LAFONTAINE

RESUME :

Les thérapies géniques constituent à l'heure actuelle l'un des plus grands défis de la recherche. Il en existe pour toutes sortes de maladies, principalement pour les cancers. Toutes sont expérimentales et aucun traitement n'est encore sorti. Pourtant, les premières expériences débutèrent dans les années 80 et les premières idées de modifier la séquence de l'ADN naissaient dans les années 70 avec la découverte des enzymes de restriction. Arrivé en 2012, après plus de 40 ans de recherches, on peut se poser quelques questions quant à la légitimité de ces expériences. En effet, de nombreux échecs sont à compter et aucune expérience n'a encore débouché sur un traitement. Quelles sont les difficultés auxquelles se heurtent les scientifiques ? Existe-t-il de réels succès ? Peut-on surmonter les problèmes rencontrés ? Cet ouvrage a donc pour but d'évaluer les perspectives qu'offrent les thérapies géniques en 2012 au travers d'un regard sur les théories, les moyens techniques, diverses expériences, les connaissances actuelles en la matière, et l'exemple de thérapies concernant deux phénomènes de société que sont la Maladie d'ALZHEIMER et le cancer bronchique à non petites cellules.

MOTS CLES : Thérapies géniques, biotechnologies, Maladie d'ALZHEIMER, Cancer bronchique à non petites cellules, perspectives, espoir.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr. Joël COULON	UMR 7564 - LCPME – CNRS Faculté de Pharmacie	Expérimentale ☐ Bibliographique ☒ Thème 1

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle