

[Accueil](#) [Santé](#) [Les Maladies orphelines.](#)

Navigation

[Controverses](#)
[Divers](#)
[Homme d'honneur](#)
[L'Afrique](#)
[L'Europe](#)
[L'Histoire](#)
[La France](#)
[La Religion](#)
[Le Monde](#)
[Mes poèmes](#)
[Santé](#)

Les Maladies orphelines.

Etudes faites par Monsieur Olivier DANOS.

Jeudi 7 septembre 2006, par [Olivier DANOS](#) // [Santé](#)

Les hommes se sont organisés pour lutter contre les maladies qui ont affecté d'importantes populations, notamment dans les pays riches où les stratégies de traitements et de recherche sont identifiées et financées.

Il n'en va pas de même pour 7 000 affections dites rares ou orphelines en raison du faible nombre de personnes concernées par chacune d'elles, car la plupart sont dues à des particularités du génome humain. Une maladie est dite rare lorsque sa prévalence - c'est-à-dire le nombre de malades atteints de cette pathologie dans une population déterminée - est inférieure à 1 sur 2 000. Elle est dite « orpheline » lorsque le nombre des personnes touchées ne permet pas de rentabiliser les investissements de l'industrie pharmaceutique. Au total, néanmoins, ces pathologies affectent un grand nombre d'individus : de 3 à 4 millions de personnes seraient touchées en France, 25 millions en Europe, 27 millions aux États-Unis et de 6 à 8 % de la population mondiale.

Les notions de maladies rares et de maladies orphelines sont différentes selon les populations considérées ou les données économiques. Ni l'Europe ni la France ne disposent de statistiques satisfaisantes, en dépit des données accumulées par l'assurance-maladie. Les chiffres admis en la matière proviennent d'études partielles et nécessitent confirmation.

Les maladies rares constituent un indéniable problème de santé publique : outre l'importance de la population touchée, des estimations émanant de l'O.C.D.E. évaluent le coût de ces maladies à celui du cancer ou des maladies cardio-vasculaires pour l'ensemble de l'Europe occidentale. De tels indices devraient inciter les États à mieux évaluer l'ampleur du phénomène.

Au-delà, la souffrance et la solitude des malades, les difficultés de diagnostics et de traitements marquent profondément ce secteur. Ces maladies présentent des traits communs : très souvent graves, chroniques et évolutives, elles mettent en jeu un pronostic vital. L'atteinte des fonctions provoque fréquemment une perte d'autonomie : Invalidité, déficience, handicap, poly-handicap. Ces maladies, non abordées durant les études de médecine pour la plupart d'entre elles sont à l'origine d'une errance diagnostique qui est le premier problème évoqué par les associations de malades, avec l'absence de réponse thérapeutique. Un sentiment d'exclusion des personnes concernées et de leur famille est à l'origine d'une souffrance morale spécifique.

Dans la même rubrique

27/08 — [7 conseils pour éviter l'hypertension artérielle](#)

23/07 — [Une nouvelle thérapie à base d'artémisinine](#)

22/07 — [Burn-out](#)

30/03 — [Soins palliatifs : cultiver la vie.](#)

30/06 — [Être Autiste.](#)

25/03 — [Prothèses PIP : les chirurgiens savaient tout, ou presque.](#)

30/01 — [L'Épilepsie.](#)

18/08 — [La Santé en danger](#)

10/04 — [Biomédecine : pour en finir avec le retard français.](#)

25/02 — [L'Orgasme !](#)

[1](#) | [2](#) | [3](#) | [4](#) | [5](#) | [6](#) | [7](#) | [8](#)

Les maladies rares posent avec acuité les questions relatives au droit à la santé. L'insuffisance de l'offre de soins disponibles et la marginalisation due à l'ignorance génèrent des injustices au regard des maladies fréquentes. Ces graves inégalités imposent aux États un meilleur partage du progrès.

L'errance diagnostique.

Les spécialistes des maladies rares, les patients et les associations dénoncent très fortement les délais excessifs qui séparent l'apparition des premiers symptômes de l'établissement du diagnostic. Cette attente, désespérante pour les malades et leur famille, génère des erreurs, des absences de traitement, des accidents, des décès ainsi que des naissances d'enfants handicapés par ces maladies héréditaires. L'ignorance qui entoure ces maladies est à l'origine de véritables catastrophes. On enregistre par conséquent des naissances multiples d'enfants handicapés dans la même fratrie : 8 enfants atteints de l'X fragile, 3 et 4 enfants de la myopathie de Duchenne...

Pour l'hémochromatose ou la myasthénie par exemple, les décès précoces ou les internements psychiatriques injustifiés sont fréquents. Il en résulte des souffrances physiques ou morales graves : multiplication des consultations, médication inadaptée, dérive vers des médecines parallèles et apparition d'un sentiment d'isolement puis d'exclusion. Les intéressés savent que le mal progresse alors qu'ils se sentent incompris par l'assurance-maladie, par la médecine et par leur entourage.

Pour la société, ces maladies engendrent des prestations inutiles, inefficaces, parfois dangereuses, et donc d'un important surcoût pour la collectivité.

Il faut noter ici le rôle des médias, journaux, radios et télévisions, qui, lorsqu'ils décrivent les symptômes des maladies rares, voient affluer les témoignages de personnes qui se sont reconnues atteintes, sont allées consulter porteuses d'une information nouvelle et ont enfin obtenu le diagnostic. Ce phénomène est à prendre en compte dans les stratégies de lutte contre l'errance diagnostique.

Les difficultés de la prise en charge.

Il est peu probable que l'on puisse aborder un si grand nombre de maladies, parfois rarissimes, durant les études de médecine. En outre, pour certaines de ces pathologies, on ne dispose pas d'une description précise ou de marqueurs fiables. Enfin, le progrès en génétique livre chaque semaine de nouveaux gènes qui subdivisent des maladies fréquentes en une multitude de maladies rares, décuplant la complexité de la mise en œuvre du diagnostic et des thérapeutiques.

Les responsables de la santé doivent intégrer la difficulté médicale et reconnaître au praticien le droit de consacrer plus de temps à ses patients. Le diagnostic biomoléculaire, lorsqu'il est devenu possible, qu'il soit pratiqué en France, en Europe ou ailleurs, doit être financé ainsi que les déplacements des familles vers les réseaux de compétences.

L'assurance-maladie, bâtie autour des grandes épidémies, n'a pas à ce jour assimilé la dimension des maladies rares et ne dispose d'aucune stratégie propre à appréhender l'ensemble du problème. Or aucun progrès ne pourra être réalisé sans une individualisation des réponses.

La prise en charge du malade est défailante. L'ignorance quasi générale des mécanismes de la maladie pénalise lourdement l'intervention des médecins généralistes, des personnels paramédicaux et des personnes qui apportent leur aide. Face à cette situation, les malades sont obligés d'être les propres garants de leur sécurité. Experts de leur propre expérience et possesseurs de leur dossier, leurs risques, leurs droits et leur rôle doivent être reconnus. Leurs associations, dotées de conseils scientifiques et médicaux, sont des interlocuteurs naturels assurant l'accompagnement du malade et de sa famille, mais proposant également aux médecins des informations médicales et sociales. Des

progrès importants sont accomplis lorsque collaborent associations de malades, cliniciens et scientifiques. La lutte contre la maladie peut alors commencer, ce qui génère fréquemment d'importants financements privés.

Il est essentiel que soit approfondi l'enseignement d'une pédagogie du doute accompagnée de l'accès à des bases de données spécialisées (par exemple, Orphanet en France) et surtout que soit instaurés rapidement des réseaux cliniques pluridisciplinaires, par groupe de maladies et offrant une assistance aux professions médicales.

Pour le médecin généraliste, il est prioritaire de savoir ce qu'il ne faut pas faire et son intervention est grandement facilitée lorsque le malade est porteur d'informations écrites permettant d'entrer en contact avec un réseau ou décrivant les risques et les traitements.

La prise en charge sociale, quant à elle, est évidemment défailante, et rejoint celle des handicaps. L'intégration scolaire, sociale et culturelle, l'accès au travail sont très souvent menacés. Le pouvoir économique est atteint : réduction ou cessation d'activités pour le malade et souvent un membre de la famille, impossibilité de recourir à l'emprunt, surcoût généré par la pathologie et le handicap. Les aides financières, humaines et techniques sont significativement inférieures aux besoins des personnes.

La mise en œuvre d'un droit à compensation confortant le risque dépendance constituerait un progrès de société. Quant à la « production familiale de santé », fondamentale dans ce domaine, elle n'est pas clairement reconnue par les pouvoirs publics, en dépit de quelques mesures qui vont dans le bon sens afin d'alléger les charges inhérentes à des situations très difficiles.

Un développement progressif des stratégies.

La recherche et le traitement des maladies génétiques rares sont totalement conditionnés par la collecte de l'A D N sous forme de panels destinés à la recherche des gènes responsables.

Ces gènes une fois découverts permettent le diagnostic de la maladie, le diagnostic pré-natal, le conseil génétique, le diagnostic pré-implantatoire. L'ensemble des connaissances alors disponibles permet d'envisager de multiples hypothèses thérapeutiques : utilisation de molécules existantes, gérothérapies, thérapie cellulaire... Dans les thérapies géniques en particulier, l'A D N peut devenir médicament, être fabriqué et réintroduit dans la cellule. Plus qu'une collection, la collecte de l'A D N constitue une filière santé qui va du diagnostic biomoléculaire à la création d'entreprises de biotechnologies. Cet A D N appelle une réflexion éthique et des lois particulières pour lesquelles la France effectue un travail permanent.

La notion de « maladie orpheline » doit être reconsidérée. En effet, les coûts d'une thérapie génique sont évalués entre 600 000 et 1 200 000 euros, contre 600 millions d'euros pour une molécule destinée à une maladie fréquente. L'exemple d'un « enfant bulle », dont le traitement est évalué à 91 000 euros, est à méditer car il semble bien qu'il s'agisse d'un acte unique pour un résultat que l'on peut espérer définitif. Cette nouvelle réalité économique ouvre des possibilités pour la création d'un tissu d'entreprises de biotechnologies.

L'Union européenne a manifesté un intérêt réel pour les maladies rares dès 1993. Le rôle du gouvernement français a été déterminant dès 1994, en particulier pour l'adoption d'un programme d'action communautaire, puis d'un règlement européen sur les médicaments orphelins en 1999. Il s'agit de mesures destinées à inciter la recherche, le développement et la mise sur le marché de ce type de médicaments.

En 1991, l'Association française contre les myopathies, associée au Centre d'étude des polymorphismes humains, créait le laboratoire Généthon dédié aux maladies rares. Il produisait dès 1993 les

premières cartes du génome humain dans le but de rechercher l'origine des maladies rares. En 2002, plus de mille gènes impliqués dans ces maladies ont été localisés et les financements associatifs ont souvent accompagné la collaboration des malades et de leurs familles.

La première thérapie génique réussie en 2000 concernait une maladie rare, et fut, elle aussi, politiquement, financièrement, fortement soutenue par deux associations de malades.

En 2001 et en collaboration avec l'État, les associations ont créé la Plate-forme maladies rares, qui comprend l'Alliance maladies rares, Eurordis (échelon européen), Orphanet et Allo-Gènes (bases de données et réponses téléphoniques).

En 2002, le gouvernement a labellisé les premiers réseaux cliniques pour la mucoviscidose et la sclérose latérale amyotrophique et a créé, avec l'Association française contre les myopathies, l'Institut européen des maladies rares.

La plupart des pays développés reconnaissent aujourd'hui l'existence de maladies rares et des médicaments dits orphelins, c'est-à-dire un produit pharmaceutique générant trop peu de retour financier pour l'industriel qui l'a développé. Il concerne des maladies rares mais également des maladies fréquentes, affectant des populations de pays dont les économies ne permettent pas d'acheter ces médicaments. Les structures mises en place communiquent et commencent à collaborer en vue d'élargir au plus grand nombre de bénéficiaires possible le champ des mesures d'accompagnement.

Les expériences pionnières d'Avery, publiées en 1944, ont montré qu'un caractère nouveau peut être apporté de manière permanente à une cellule par transfert d'ADN. La généralisation de cette notion et les explorations de la génétique moléculaire ont, par la suite, naturellement donné naissance à l'idée simple de la thérapie génique. Celle-ci propose d'intervenir sur la cellule malade en agissant sur son programme et non plus sur ses composants, ce qui demande de développer des outils nouveaux, les vecteurs, capables de transporter l'information thérapeutique jusqu'au noyau des cellules à traiter.

Plus de 500 essais cliniques utilisant des vecteurs de thérapie génique ont été organisés depuis 1989 (www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical). Ils s'adressent à de nombreuses pathologies et mettent en lumière les avantages et les inconvénients des systèmes vecteurs courants. Ils permettent de préciser le cahier des charges sur lequel s'appuie le développement d'outils améliorés pour le transfert de gène.

Le vecteur doit tout d'abord être capable de compacter les acides nucléiques, car quelques milliers de paires de bases d'A D N (la taille d'un petit gène) occupent en solution un volume comparable à celui d'une cellule. Les séquences thérapeutiques (transgène) doivent être protégées de la destruction provoquée par les agents physiques et biologiques (enzymes) actifs dans le milieu. Le vecteur doit aussi assurer le franchissement des multiples membranes de la cellule (plasmique, vacuolaire et nucléaire) et le cheminement efficace de sa « cargaison » jusqu'au noyau. Une fois arrivé à bon port, le transgène devra y demeurer, afin de conférer une modification thérapeutique durable. Les nombreuses applications envisagées de la thérapie génique exigeront que l'expression de l'information génétique nouvelle soit strictement contrôlée dans l'espace et dans le temps, au moyen d'éléments intégrés dans le vecteur. Ceux-ci devront permettre d'atteindre sélectivement une cible cellulaire dans une population complexe (ciblage), ou de restreindre et de contrôler la lecture de l'information thérapeutique par la cellule modifiée (expression régulée du transgène). Enfin, il est vraisemblable que les procédures de thérapie génique mobiliseront contre elles le système immunitaire du receveur, et un système vecteur idéal devra être en mesure de contourner cet écueil.

Depuis une vingtaine d'année, la vectorologie a émergé comme une branche de la virologie moléculaire car elle cherche à utiliser des virus modifiés et atténués pour créer des outils de transfert de gène. Les virus sont des assemblages d'acides nucléiques et de protéines qui, pour se reproduire, détournent l'activité de la cellule où ils se logent à leur profit. Ils y parviennent en reprogrammant leur hôte par transfert de gène, et ont élaboré au cours de leur évolution des stratégies d'une efficacité et d'une variété étonnantes. S'inspirant de ces processus naturels, la vectorologie dite non virale s'attache à concevoir des molécules de synthèse qui forment, avec l'ADN, des complexes capables de cheminer jusqu'au noyau des cellules. Nous décrivons ici les propriétés des principaux vecteurs utilisés dans l'expérimentation clinique humaine.

Grâce à eux, des étapes historiques ont déjà été franchies en matière de thérapie génique.

Dès 1990, à Bethesda, aux États-Unis, Michael Blaese a tenté de corriger un grave déficit immunitaire touchant l'adénosine déaminase (ADA) chez une fillette de quatre ans. Dix ans plus tard (fin avril 2000), Alain Fischer et Marina Cavazzana-Calvo ont pu corriger, à l'hôpital Necker-Enfants-Malades de Paris, un déficit immunitaire combiné sévère transmis par le chromosome X en réinjectant au jeune patient des cellules de leur moelle osseuse modifiée ex vivo à l'aide d'un vecteur viral apportant le gène gC qui leur manquait.

Principe de l'obtention des vecteurs viraux.

Une particule virale est composée d'une coque appelée capsid, dont la taille peut varier entre 20 nm et près de 1 µm, et qui renferme des acides nucléiques (ADN ou ARN) à l'état compacté. Les virus reconnaissent à la surface des cellules des récepteurs (protéines, sucres ou lipides) qui permettent leur entrée et la libération de leur matériel génétique dans le cytosol. Le cheminement de ce génome viral jusqu'au noyau mobilise divers composants cellulaires (cytosquelette, organelles d'import nucléaire). Certains virus, à fort taux de multiplication, comme les adénovirus, ne possèdent pas d'éléments leur permettant de maintenir leur génome de manière continue dans la cellule infectée. En revanche, d'autres virus établissent une infection latente au cours de laquelle leur génome est stabilisé. Dans le cas des rétrovirus, le génome pénètre dans le noyau cellulaire accompagné d'une enzyme qui catalyse l'insertion de l'ADN dans la continuité du génome de l'hôte et assure ainsi sa pérennité.

Un vecteur viral doit être un cheval de Troie, doté d'une capsid identique à celle du virus de départ, mais qui renferme un génome viral modifié (recombinant) porteur du transgène. À l'encontre de l'infection virale, son entrée dans la cellule ne conduira pas à la production de nouvelles particules, mais permettra le transfert de l'information contenue dans le transgène. Pour obtenir un vecteur, le génome du virus est manipulé sous forme d'un ADN propagé dans une bactérie, au moyen des outils usuels du génie génétique. Les séquences codant pour les protéines virales (fonctions trans) sont séparées de celles qui servent d'éléments régulateurs pour la réplication et l'expression des gènes (fonctions cis). Les fonctions trans sont introduites dans des cellules en culture qui produisent alors des capsides vides, dépourvues de génome. Ces cellules sont appelées « cellules d'emballage ». Les fonctions cis sont pour leur part utilisées pour construire un génome recombinant dans lequel elles sont associées au transgène. Les génomes recombinants, lorsqu'ils sont introduits dans les cellules d'emballage, sont incorporés dans les capsides et donnent naissance au vecteur. De multiples systèmes de vecteurs viraux ont été développés, chacun représentant une variation sur ce thème général. Chaque type de vecteur viral peut être modifié pour assurer le ciblage des particules vers des récepteurs particuliers, ou pour inclure des systèmes d'expression de gènes multiples, régulés ou spécifiques de

types cellulaires choisis.

Vecteurs rétroviraux.

Les vecteurs dérivés de rétrovirus ont été utilisés chez l'homme dans environ 200 essais cliniques menés depuis 1989 sur près de 1 750 patients. Ils ont été à l'origine du premier vrai succès de la thérapie génique où un défaut génétique chez des patients atteints d'immunodéficiences combinées sévères a pu être compensé. Les rétrovirus dont sont dérivés ces vecteurs transforment au cours de leur cycle réplcatif leur génome constitué d'ARN en A D N, et insèrent celui-ci dans un chromosome de la cellule infectée. La plupart des vecteurs rétroviraux ont été construits à partir d'un rétrovirus de la souris, non pathogène pour l'homme, le virus leucémogène murin (Murine Leukemia Virus, MLV). On dispose aujourd'hui pour ces vecteurs rétroviraux de plusieurs lignées cellulaires d'emballage dans lesquelles sont synthétisées les protéines virales et qui produisent de manière permanente des virions dépourvus de génome. Après y avoir introduit un génome recombinant assemblé in vitro, on recueille dans le milieu de culture le vecteur rétroviral actif, c'est-à-dire capable de transférer son matériel génétique de manière permanente à des cellules en culture, ou à l'intérieur d'un tissu organisé.

Il est théoriquement possible d'obtenir un ciblage des vecteurs en modifiant les propriétés d'une protéine (SU) présente à la surface du virion et dont le rôle est de reconnaître un récepteur cellulaire, mais les démonstrations d'efficacité de ces approches, bien que réelles, restent pour le moment limitées. La conception des lignées d'emballage cherche à éviter les événements de recombinaison pouvant conduire à la formation de virus compétents pour la réplication lors de la préparation des vecteurs. Le niveau de sécurité atteint aujourd'hui est compatible avec une utilisation clinique. Jusqu'à 107 particules actives par millilitre peuvent ainsi être produites de manière continue, dans des cultures maintenues en bio-réacteur, puis purifiées et concentrées. Ces systèmes de production ont été adaptés aux bonnes pratiques de fabrication, pour la production de vecteurs utilisables en clinique.

En insérant l'information thérapeutique dans la continuité d'un chromosome de la cellule, les vecteurs rétroviraux sont en mesure de modifier celle-ci de manière permanente. La faiblesse du dispositif réside dans l'impossibilité de diriger l'intégration du transgène vers un site chromosomique précis, ce qui peut conduire à l'insertion dans une région chromosomique muette, incompatible avec l'expression de la cassette thérapeutique, et donc à une baisse d'efficacité des vecteurs. Des travaux en cours cherchent à adjoindre au vecteur des séquences dites isolantes, qui permettraient le fonctionnement de la cassette indépendamment du site d'insertion. On peut également s'inquiéter des effets délétères d'une insertion au hasard, en particulier d'événements pouvant conduire à une dérégulation du cycle cellulaire et à une transformation tumorale. Dans la pratique, de tels événements n'ont pas été observés, sans doute parce que ces cibles indésirables sont rares et que la transformation maligne n'apparaît qu'à la suite de plusieurs événements mutagènes. La technologie actuelle, en l'absence de ciblage de l'insertion, n'élimine donc pas ce risque, mais le rend indétectable en l'absence de virus compétent pour la réplication dans les préparations de vecteur.

La principale limitation des vecteurs dérivés du MLV est leur activité médiocre en l'absence de division cellulaire. Cela limite leur utilisation à des cellules dont la croissance est stimulée soit in vitro par l'adjonction de facteurs de croissance, soit in vivo par des procédures souvent invasives. Le développement récent de vecteurs dérivés de rétrovirus complexes, les lentivirus, semble pouvoir lever cette contrainte. En particulier, des vecteurs dérivés du virus de l'immunodéficiences humaine (VIH) présentent une activité remarquable sur de nombreuses cibles d'intérêt (cellules souches hématopoïétiques, hépatocytes, neurones). La nature du virus de départ impose ici des contraintes de

sécurité particulière, mais la conception des vecteurs, qui n'utilise qu'une partie de l'information génétique du VIH et élimine les possibilités de recombinaison, permet à terme d'envisager une utilisation clinique.

Vecteurs adénoviraux.

Les vecteurs adénoviraux ont fortement retenu l'attention pour le développement de thérapies géniques, étant donné leur efficacité et leur mode de préparation simple et adaptable à l'échelle industrielle. Cependant, les études chez l'animal et les essais cliniques réalisés (140 essais sur 620 patients) ont révélé des limitations et un sérieux problème de toxicité qui ont conduit à reconsidérer sérieusement la technologie.

Les adénovirus sont largement répandus dans les populations humaines et animales, où ils sont responsables d'affections bénignes. Ils se multiplient rapidement et détruisent la cellule infectée. Leur génome est porté par une molécule d'ADN linéaire d'environ 35 kb (kilobase : un millier de bases de l'ADN), qui code pour une trentaine de protéines. Un premier groupe de gènes spécifie des protéines régulatrices qui interviennent dans les étapes précoces de la réplication du virus en forçant la machinerie cellulaire à produire de nombreuses copies du génome. Un deuxième groupe correspond aux protéines qui formeront les capsides renfermant ces génomes. La nature lytique du virus, ainsi que le grand nombre de protéines impliquées de manière strictement contrôlée dans le temps, rend extrêmement complexe le développement de systèmes cellulaires stables destinés à l'emballage de vecteurs adénoviraux. Les vecteurs ont donc été développés en utilisant une lignée cellulaire exprimant un seul gène viral précoce clé appelé E1.

Ces cellules permettent la réplication d'un adénovirus défectif dans lequel on a substitué au gène E1 un transgène et sa cassette d'expression. Ce vecteur, même s'il conserve la plupart des gènes viraux d'origine, ne pourra être multiplié dans un environnement cellulaire normal d'où le gène E1 est absent. Il pourra en revanche transporter le transgène jusqu'au noyau des cellules traitées, avec une efficacité remarquable. De nombreuses cibles cellulaires ont ainsi été modifiées, tant in vitro qu'après injection directe du vecteur in vivo. Le mode de préparation et de purification des vecteurs adénoviraux est simple, étant donné les fortes concentrations atteintes (105 particules par cellule en 24 heures, soit mille fois plus qu'un rétrovirus). L'adaptation des méthodes de préparation aux bonnes pratiques de fabrication n'a pas rencontré d'obstacle majeur.

Il existe cependant plusieurs difficultés liées à la préparation et à l'utilisation des vecteurs de première génération. La première est due au caractère imparfait des cellules de complémentation par E1 utilisées à l'origine. On observe en effet que le génome adénoviral défectif qui se réplique par complémentation peut récupérer les séquences E1 qui lui manquent par recombinaison avec le chromosome de la cellule. Cet événement est rare, mais statistiquement inévitable étant donné le grand nombre de copies du génome viral qui s'accumulent dans le noyau cellulaire. Il conduit à une contamination indésirable des stocks avec de l'adénovirus réplcatif. De nouvelles cellules de complémentation dans lesquelles ce problème est évité sont aujourd'hui disponibles. Un inconvénient plus sérieux des vecteurs de première génération est que, dans certaines conditions, ils sont capables de se répliquer à bas bruit, même en l'absence de E1. Les protéines du virus toujours codées par le vecteur sont alors synthétisées et provoquent de violentes réponses immunitaires contre la cellule qui les produit. C'est la cause principale de la disparition rapide des effets du transfert de gène, souvent observé in vivo. La solution à ces problèmes consiste à verrouiller plus avant le système. Des vecteurs de deuxième, puis de troisième génération, dans lesquels on a éliminé d'autres gènes précoces (E2, E3, E4) peuvent être propagés sur des lignées de complémentation plus sophistiquées. Le stade ultime de cette

amélioration technologique conduit à des vecteurs entièrement dépourvus de gènes viraux (on parle de vecteurs étripés) qui ne peuvent pas être complétés par un système cellulaire stable et sont donc produits en présence d'un adénovirus répliquatif qu'il convient ensuite d'éliminer. La purification des vecteurs étripés pour une utilisation clinique pose encore problème aujourd'hui.

Vecteurs AAV.

Certaines propriétés d'une famille de parvovirus, les virus associés à l'adénovirus (adeno-associated virus, AAV) ont retenu l'attention des concepteurs de vecteurs. Ils sont de petite taille et diffusent donc mieux dans les tissus, résistent à des conditions extrêmes de pH et de température, aux détergents, voire aux solvants, ce qui facilite les étapes de purification et de formulation galénique. De plus, ils peuvent infecter des cellules d'origine tissulaires diverses et stabilisent leur génome par intégration dans un chromosome.

Les AAV ne peuvent pas accomplir leur cycle répliquatif seuls et se comportent en parasites de l'adénovirus, mais aussi des herpès ou des papillomavirus. Ils sont largement présents dans les populations humaines, sans conséquences pathologiques connues. La persistance latente du virus est asymptomatique, et certaines observations épidémiologiques et moléculaires lui attribuent même une activité antitumorale. Le génome viral d'environ cinq mille nucléotides présente une organisation compacte avec deux gènes codant, l'un pour les protéines de régulation et de répllication (rep), l'autre pour les protéines structurales (cap). Les séquences nécessaires en cis à la répllication du génome et à son empaquetage sont contenues dans un segment de 145 nucléotides retrouvé à chaque extrémité du génome (inverted terminal repeat, ITR).

Les vecteurs dérivés d'AAV sont constitués de ces courtes répétitions, associées au transgène. Comme dans le cas des vecteurs rétroviraux, aucune séquence codant pour des protéines virales n'est maintenue. La production de particules recombinantes est réalisée dans des cellules en culture dans lesquelles on introduit des plasmides portant l'information pour les protéines rep et cap, ainsi que les fonctions auxiliaires codées par le génome de l'adénovirus. La multiplication et l'empaquetage des génomes AAV recombinants s'effectue dans ces conditions avec une efficacité dix à cent fois moindre que pour le virus d'origine, avec 100 à 1 000 particules de vecteur produites par cellule.

Les vecteurs AAV se sont révélés d'une grande efficacité dans le muscle et le système nerveux central, ainsi que dans le foie. Une administration unique chez l'animal conduit à la modification permanente des cellules différenciées du tissu. L'expression du transgène est maintenue indéfiniment, et ne conduit généralement pas à une mobilisation indésirable du système immunitaire. La possibilité d'un ciblage par modification des propriétés de surface a été démontrée. On notera également qu'en raison de différences subtiles dans la structure de leur capsid, des vecteurs dérivés de sous-groupes (sérotypes) différents présentent chacun un spectre de cibles particulier. C'est par exemple le cas de l'AAV de type 1 qui peut être jusqu'à cent fois plus efficace que l'AAV de type 2 pour le transfert de gène dans le foie.

Les méthodes de préparation des vecteurs AAV sont encore artisanales et peu adaptées à l'échelle industrielle. Les développements technologiques récents indiquent cependant que des systèmes plus adaptés à la production de médicament seront disponibles à moyen terme. Autre inconvénient, les séquences véhiculées ne peuvent excéder 4,5 kb, ce qui limite le champ des applications thérapeutiques. Celui-ci a commencé à être exploré dans une dizaine d'essais cliniques s'adressant à une quarantaine de patients, en particulier pour le traitement de l'hémophilie B après injection intramusculaire du vecteur.

Vecteurs non viraux.

On oppose souvent l'approche « naturellement efficace » de la vectorologie virale à celle qui base le développement d'outils de transfert de gène sur la rationalisation et la synthèse chimique. En contrôlant chacun des composants du vecteur, on cherche à s'affranchir de la complexité, de la reproductibilité difficile et du coût important des préparations obtenues à partir de cellules en culture. On souhaite également contourner l'immunogénicité indésirable des particules virales. Tout en cherchant à s'éloigner des virus, la vectorologie non virale s'inspire abondamment des solutions que ceux-ci apportent au problème du transfert de gène. Certains vecteurs de synthèse sont d'une grande efficacité pour modifier des cellules en culture, mais les performances *in vivo* restent à améliorer. Une soixantaine d'essais cliniques utilisant des lipides cationiques ont été organisés.

Un premier type de vectorisation non virale consiste à incorporer *in vitro* l'ADN dans des liposomes, structures sphériques formées d'une bicouche lipidique analogue aux membranes cellulaires, ou encore à l'associer à des microsphères composées de polymères biodégradables. Malheureusement, le taux d'inclusion de molécules d'ADN autres que des oligonucléotides reste très faible, et l'efficacité du transfert de gène par cette approche est limitée.

Certains lipides, qui possèdent un groupement chimique chargé positivement au pH physiologique, apportent une solution intéressante. Ils interagissent avec les charges négatives des phosphates de l'ADN et provoquent une condensation de la molécule. Les chaînes hydrophobes permettent l'organisation de bicouches lipidiques qui enrobent la molécule d'ADN. En présence d'un lipide auxiliaire (DOPE), on obtient une structure dotée d'un excès de charges positives en surface, qui pénètre efficacement dans les cellules. Des polymères cationiques dépourvus de structures hydrophobes, tels que la polyéthylèneimine (PEI), ou encore certains oligopeptides peuvent aussi compacter efficacement l'ADN et conduisent à des transfections efficaces. L'interaction complexe/cellule peut être renforcée et l'entrée ciblée vers des récepteurs choisis en greffant chimiquement des ligands (sucre, acide aminé, stéroïde, etc.) sur les composants de base du vecteur.

L'entrée dans la cellule s'effectue par endocytose, c'est-à-dire par captation du matériel exogène associé à un récepteur par invagination de la membrane plasmique et formation d'une vésicule endosomale. Les agents de transfection les plus efficaces sont ceux qui sont capables d'assurer la sortie des endosomes, ce qui permet la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme. Certains lipides cationiques ou peptides deviennent fusiogènes dans l'environnement acide de l'endosome. La PEI agit grâce à sa forte capacité à fixer des protons et provoque une rupture de l'endosome par choc osmotique. Certains peptides liés à l'ADN par leurs résidus basiques sont aussi d'induire la lyse de l'endosome à pH acide. Enfin, le transport vers le noyau est une étape qui limite sévèrement l'efficacité des vecteurs de synthèse. Il peut être facilité environ vingt fois par l'addition de peptides dits karyophiles.

La technologie des vecteurs de transfert de gène utilisables en clinique humaine est en évolution rapide. Le développement récent des vecteurs dérivés de lentivirus et d'AAV a permis des avancées significatives en laboratoire, et celles-ci devront être confirmées en clinique lorsque les problèmes techniques liés à la production de ces vecteurs seront résolus. On est cependant loin de pouvoir réaliser les très nombreuses applications potentielles de la thérapie génique. L'une des raisons est que la réponse immunitaire au transfert de gène disqualifie souvent ces approches. Celle-ci a trois composantes possibles : la particule formée par le vecteur lui-même, qui peut être particulièrement immunogène puisqu'elle ressemble à s'y méprendre à un virus ; les protéines virales résiduelles éventuellement codées par le vecteur (cas de l'adénovirus) ; et enfin la protéine thérapeutique elle-même. Le déclenchement et l'intensité d'une réponse immune à l'issue du transfert de gène dépendent de plusieurs paramètres, liés au vecteur, qu'il faudra pouvoir contrôler. L'inflammation est provoquée par les impuretés présentes

dans la préparation, mais certaines particules virales (adénovirus) stimulent d'elles-mêmes sa survenue.

La capacité du vecteur à transférer un gène à des cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, macrophages) peut également être lourde de conséquences (de ce point de vue l'AAV possède un avantage certain). Enfin la structure et le site cellulaire de synthèse de la protéine thérapeutique déterminera aussi la nature de la réponse immune. La compréhension des mécanismes impliqués est nécessaire pour que soit possible un élargissement du champ d'application de la thérapie génique. Les questions posées ici rejoignent celles qui préoccupent depuis longtemps les vaccinologues et il est probable que l'interaction entre spécialistes des deux domaines sera fructueuse.

Olivier DANOS

[Répondre à cet article](#)

Copyright © 2007 Innovation Democratique | Tous droits réservés
Habillage de [G. Wolfgang](#) | [Squelette Multiflex](#) pour [SPIP](#) | [XHTML 1.0](#) | [CSS 2.0](#)