

# Thérapie génique

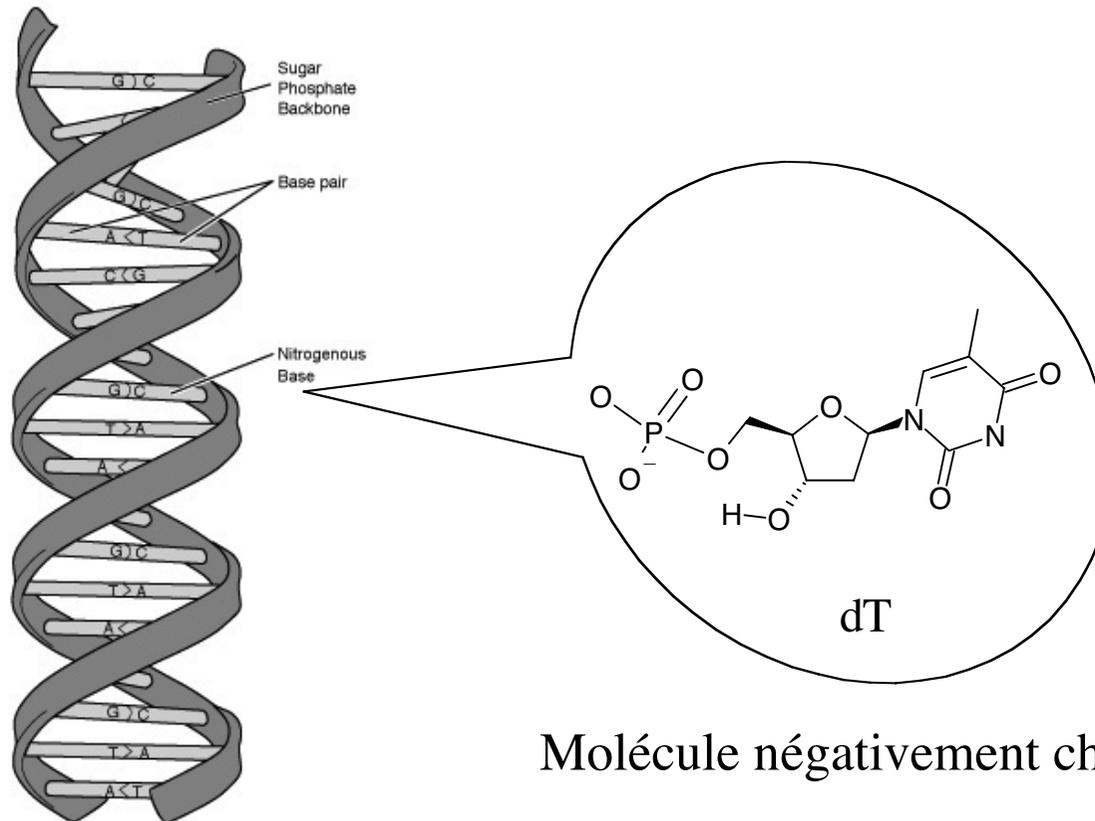
**Concept : administration thérapeutique d'acides nucléiques**

Enjeu initial : correction d'anomalies génétiques en remplaçant un gène déficient par un gène fonctionnel

Aujourd'hui : champs d'application plus vaste en particulier maladies incurables tels que cancer, maladies vasculaires, arthrite, désordres neurodégénératifs

150 protocoles cliniques établis soit environ 1000 patients traités

# Qu'est-ce qu'un gène ?

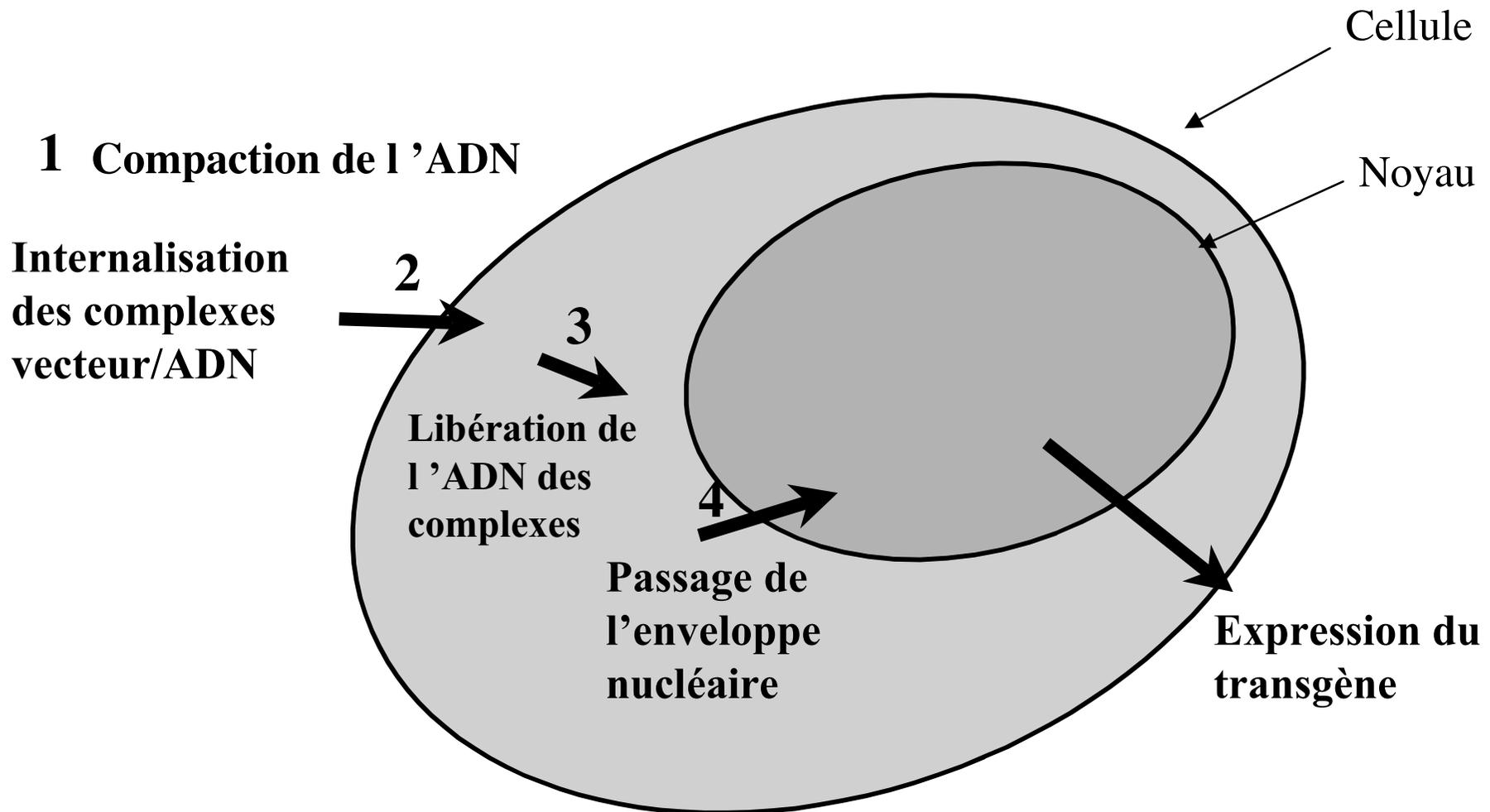


Molécule négativement chargée

L'ADN ou acide desoxyribonucléique transporte l'information génétique d'une cellule.

Il est constitué de deux brins parallèles reliés entre eux par des liaisons de type Watson-Crick entre les paires de base des nucléotides (adenine (A), guanine (G), cytosine (C), and thymine (T)).

# Transfert d'un gène dans une cellule



Solution = vecteur ?

Conception du vecteur

- Association avec ADN (cationique ou ?)
- Protection de l'ADN
- Interaction avec la membrane cellulaire
- Internalisation
- Libération (contrôlée ?)

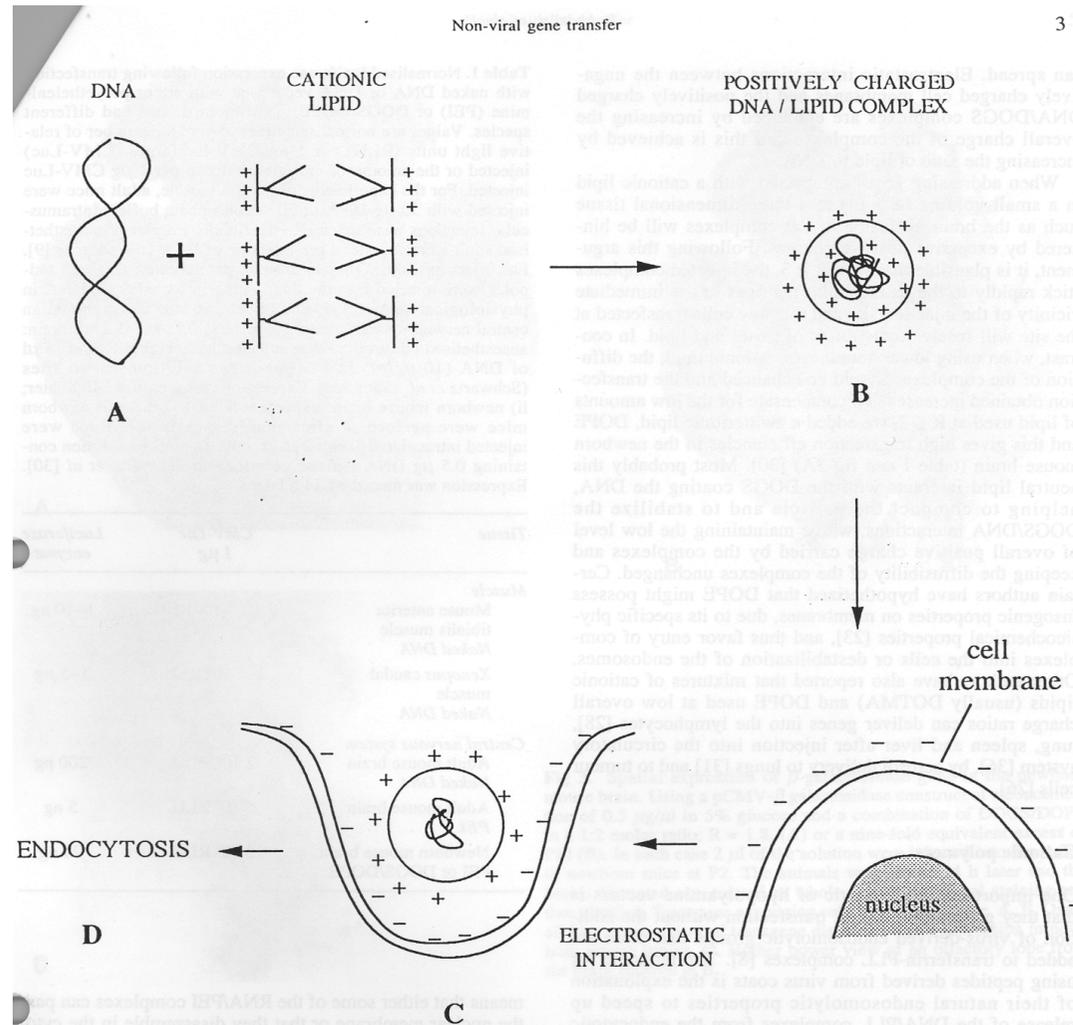


Fig 2. Schematic representation of the condensation of DNA by cationic lipids (A) and the interaction of the positively charged complexes (B) with the anionic cell surface (C), provoking endocytosis (D).

# Les vecteurs viraux

Il a été montré à la fin des années 60 que les virus étaient capables de surmonter les barrières cellulaires et de transférer spécifiquement le matériel génétique dans les cellules. Ils ont donc naturellement été utilisés comme vecteurs de transfert de gènes. Ils représentent 75 % des essais cliniques de thérapie génique.

3 grandes familles se discernent :

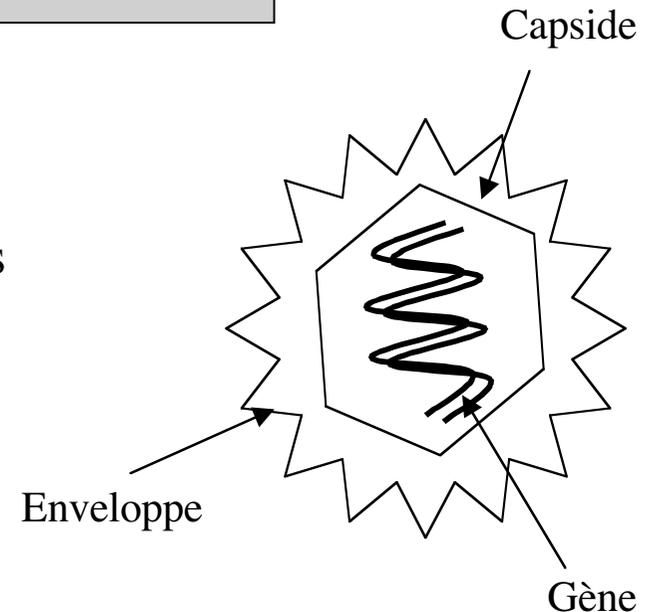
Les **rétrovirus** intègrent le gène dans les chromosomes hôtes avec une stabilité à long terme.

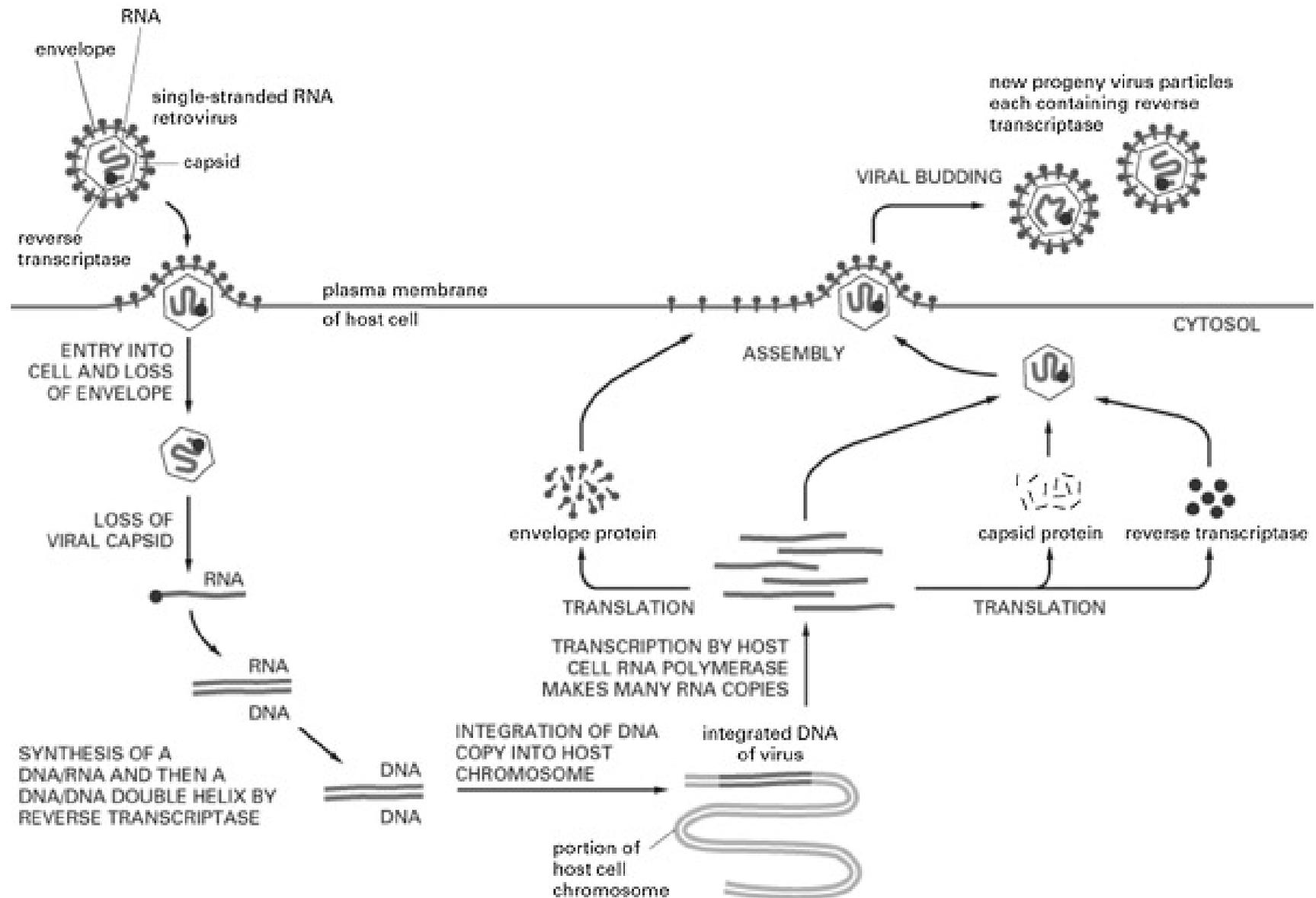
Les **adénovirus** n'intègrent pas le gène dans les chromosomes hôtes d'où une efficacité transitoire

Les **virus associés aux adénovirus** ou AAV intègrent le gène dans les chromosomes hôtes mais leur petite taille ne leur permet d'accepter que peu d'ADN.

Malgré leur bonne efficacité de transfection, les inconvénients présentés par ces vecteurs sont importants

- effets toxiques résultant de réponses immunes et inflammatoires
- transfection de transgènes de taille limitée





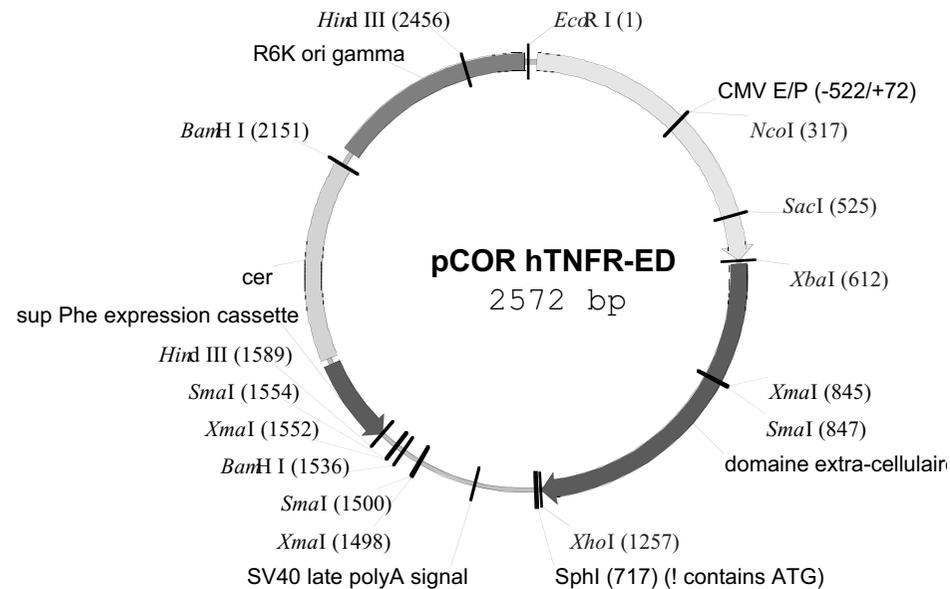
# Les vecteurs non viraux

## 1- Le plasmide (Patrick kreiss)

Des études visent à modifier le plasmide afin d'améliorer le transfert de gènes et augmenter la sécurité.

L'ADN plasmidique utilisé pour le transfert de gène par voie non-virale contient une cassette d'expression et des séquences qui permettent l'amplification du plasmide par des bactéries.

pCOR hTNFR-ED



## 2- Vecteurs non viraux : transfert de gène *in vitro*

### - Phosphate de calcium

Développée dans les années 1960, c'est une méthode simple et peu honoreuse. Elle consiste à faire précipiter l'ADN par interaction des phosphates avec les ions calcium dans du tampon phosphate. Le précipité ajouté aux cellules induit une transfection. Inconvénient : peu efficace

### - Microinjection (V. Escriou)

Le plasmide est directement injecté dans le noyau de la cellule.

Avantage : « proof of concept » en recherche

Inconvénient : demande un équipement adapté, la microinjection est réalisée sur une cellule isolée

### - Electroporation

Application d'un champs électrique induisant la formation de pores dans la membrane cellulaire qui permettent à l'ADN de passer.

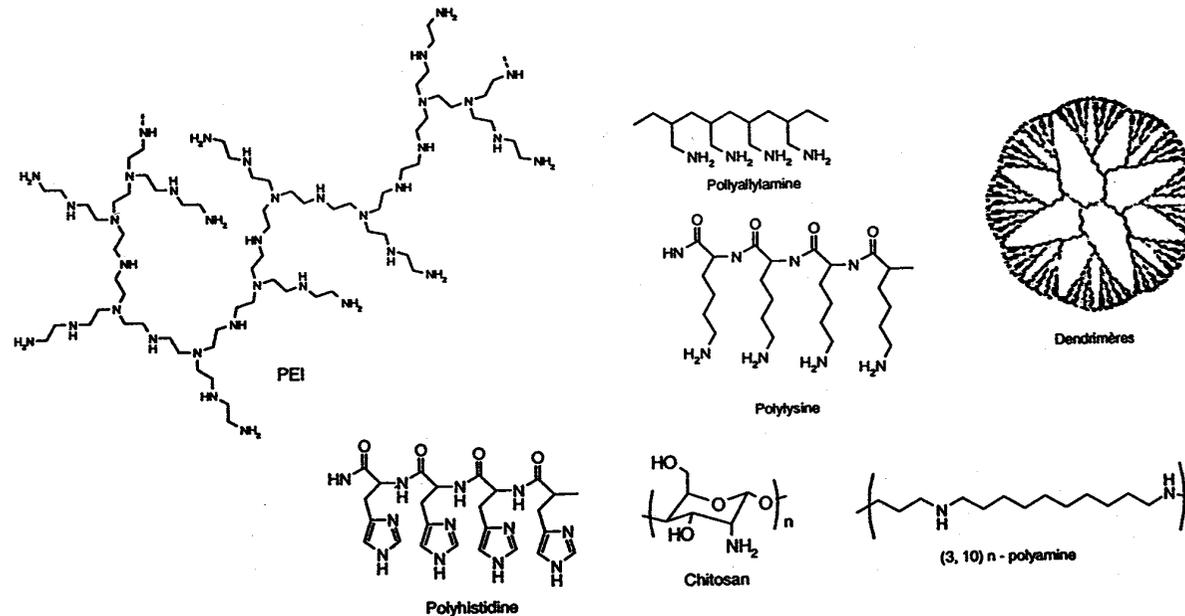
Inconvénient : importante mortalité cellulaire, mise au point laborieuse

### 3- Transfert de gène *in vitro* et *in vivo* : les vecteurs synthétiques

#### - polymères cationiques

Ex : poly(L-lysine), protamine, polyéthylèneimine (PEI), dendrimères cationiques

Association électrostatique avec l'ADN pour former des **polyplexes**



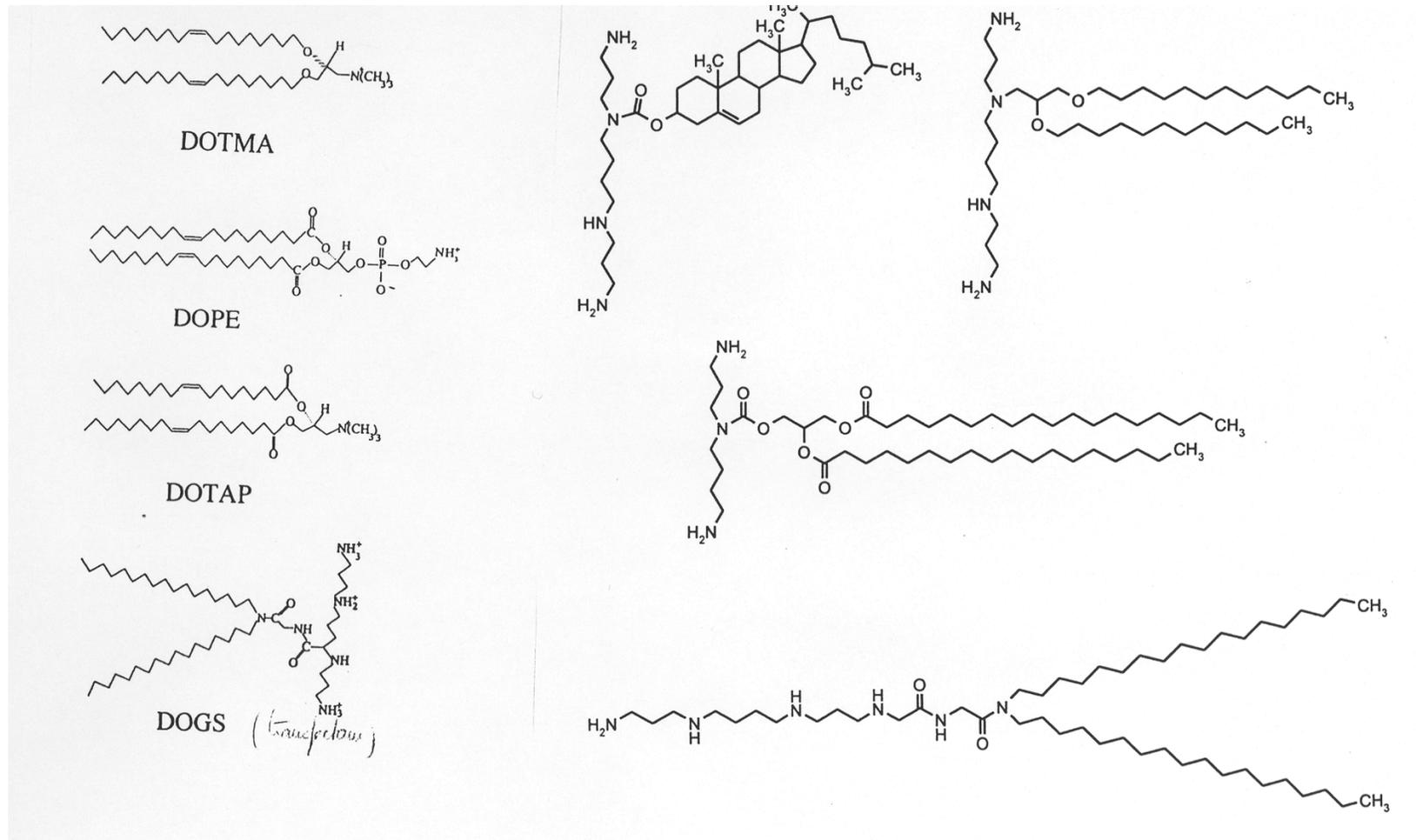
Exemples de polymères polycationiques

Intérêt : interaction cellule/polyplexe; libération de l'ADN; Vecteurs efficaces *in vitro*

# - lipides cationiques

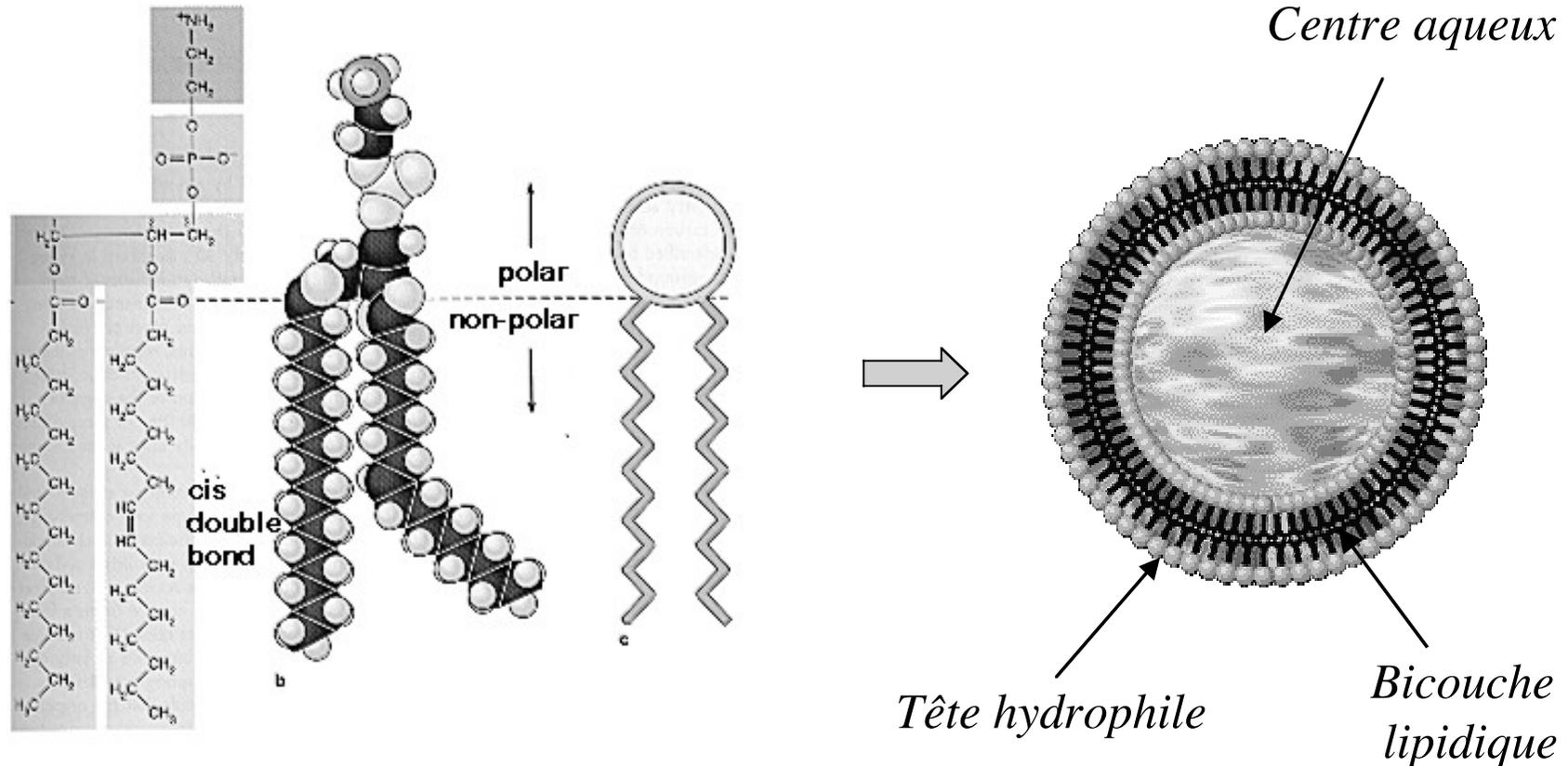
Ex : DOTMA, DOGS, DOTAP

Amphiphiles cationiques, interactions électrostatiques avec l'ADN pour former des **lipoplexes**



## - liposomes

Vésicules lipidiques constituées d'une ou plusieurs couches de phospholipides séparées par un espace aqueux dans lequel peut être encapsulé l'ADN



Utilisés *in vivo* pour libérer de petites drogues dans des temps prolongés.

Limitations pour application à l'ADN : encapsulation faible de l'ADN, vésicules trop grosses

Les liposomes, caractérisés par Bangham, ont initialement été développés comme modèle de membranes biologiques. Leur application comme système de libération contrôlée de principe actif est beaucoup plus récente. Les liposomes sont les plus petites vésicules artificielles de formes sphériques qui peuvent être obtenues à partir de phospholipides et de cholestérol, molécules naturelles non toxiques.

### **Avantage des liposomes**

- Augmentation de la stabilité du principe actif via l'encapsulation
- Réduction de la toxicité de l'agent encapsulé
- Augmentation de l'efficacité
- Augmentation des effets pharmacocinétiques
  - élimination réduite
  - prolongation du temps de circulation
- Ciblage passif ou actifs via fonctionnalisation des constituants

### **Limite de liposomes**

- Nature de l'agent à encapsulé
- Taille des particules (RES) et charge de surface
- Facilité de préparation
- Efficacité d'encapsulation
- Efficacité de ciblage

## Liposomes : avec quel type de molécules ?

Liposomes are prepared using **lipid** or combination of lipids. The one commonly encountered in liposome formulations are **phospholipids**.

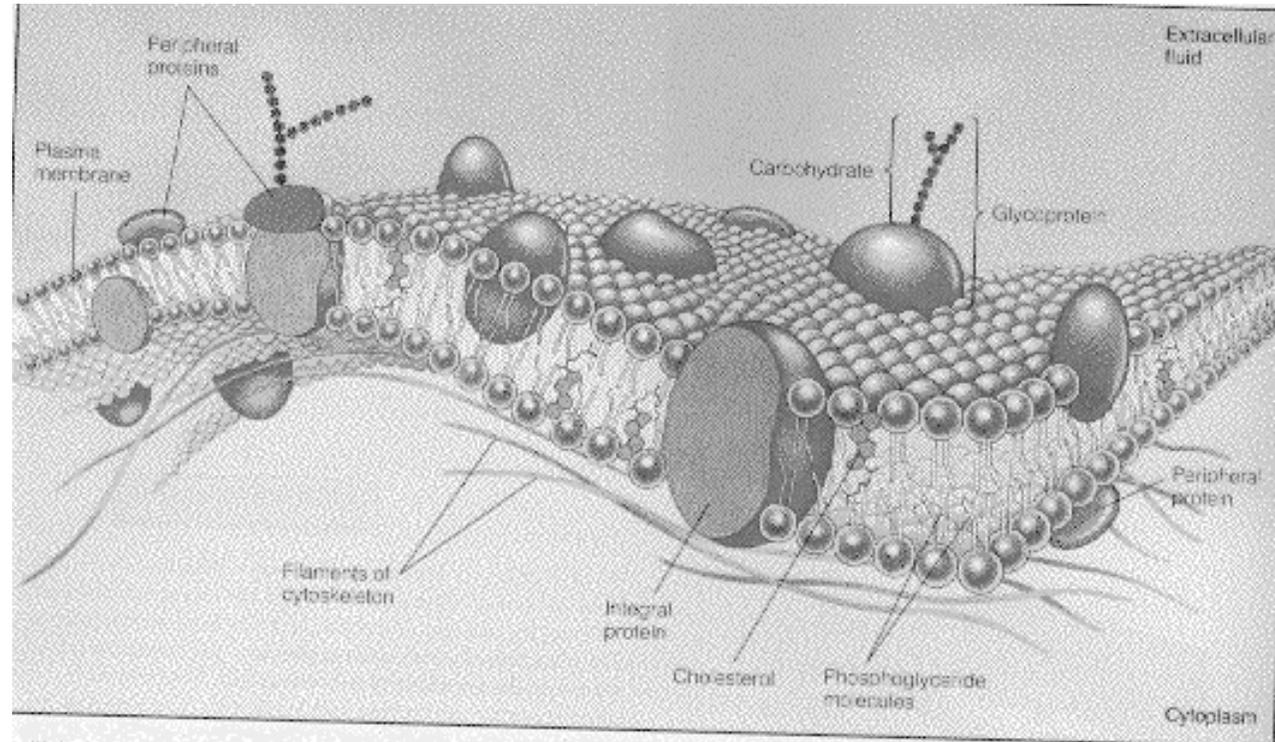
Data on lipid **polymorphism** (bilayer configuration, hexagonal phase) and knowledge of the **phase transition temperature** of the lipid is a must when formulating liposomes, because not all lipids result in bilayers.

An example of a lipid that does not form bilayer, instead forms hexagonal phase is phosphatidylethanolamine.

By altering lipid composition, one can change **permeability**.

**Cholesterol** is usually incorporated in liposomes to confer serum stability, but its inclusion has dramatic effects on vesicular properties. Inclusion of **gangliosides** (GM1), **sphingomyelin**, and PEG polymerized lipids result in increased circulation longevity.

# Membrane cellulaire schématisée

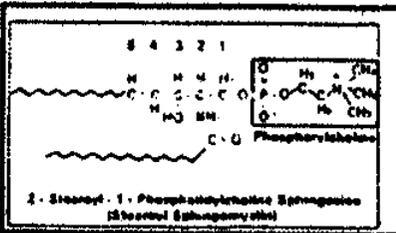
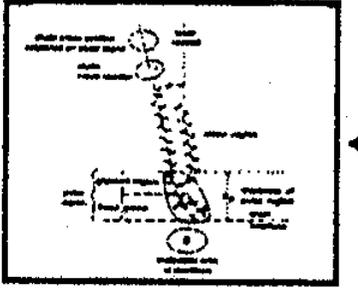
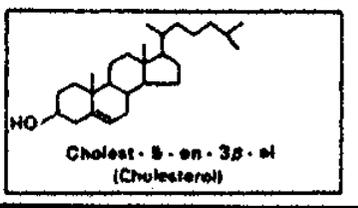
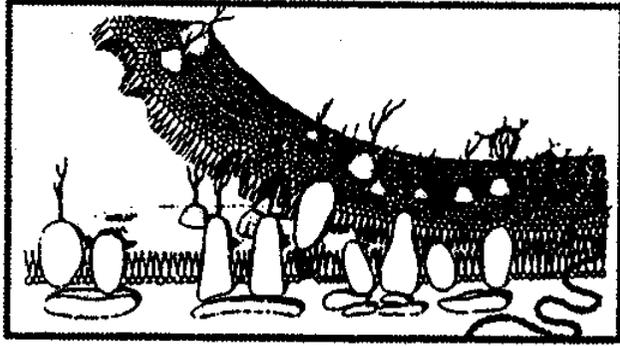


Constituants de la membrane cellulaire

## - **Phospholipides**

- diacylphosphoglycérides ou phospholipides
- diacylglycoglycérides ou glycolipides
- sphingolipides
- stérols

## - **Protéines**



- Membrane plasmique hépatique
- Membrane plasmique érythrocytes
- myéline
- Membrane externe (mitochondrie)
- Réticulum endoplasmique
- E.Coli

Chol	17	23	22	3	6	0
PE	7	18	15	35	17	70
PS (-)	4	7	9	2	5	-
PC	24	17	10	39	40	-
Sph	19	18	8	-	5	-
Glyco-lip	7	8	28	-	-	-
Autres	22	13	8	21	27	30

Glycérophospholipides  
 (35-70%)  
 Phospholipides  
 (42-70%)

# Structure chimique des phospholipides

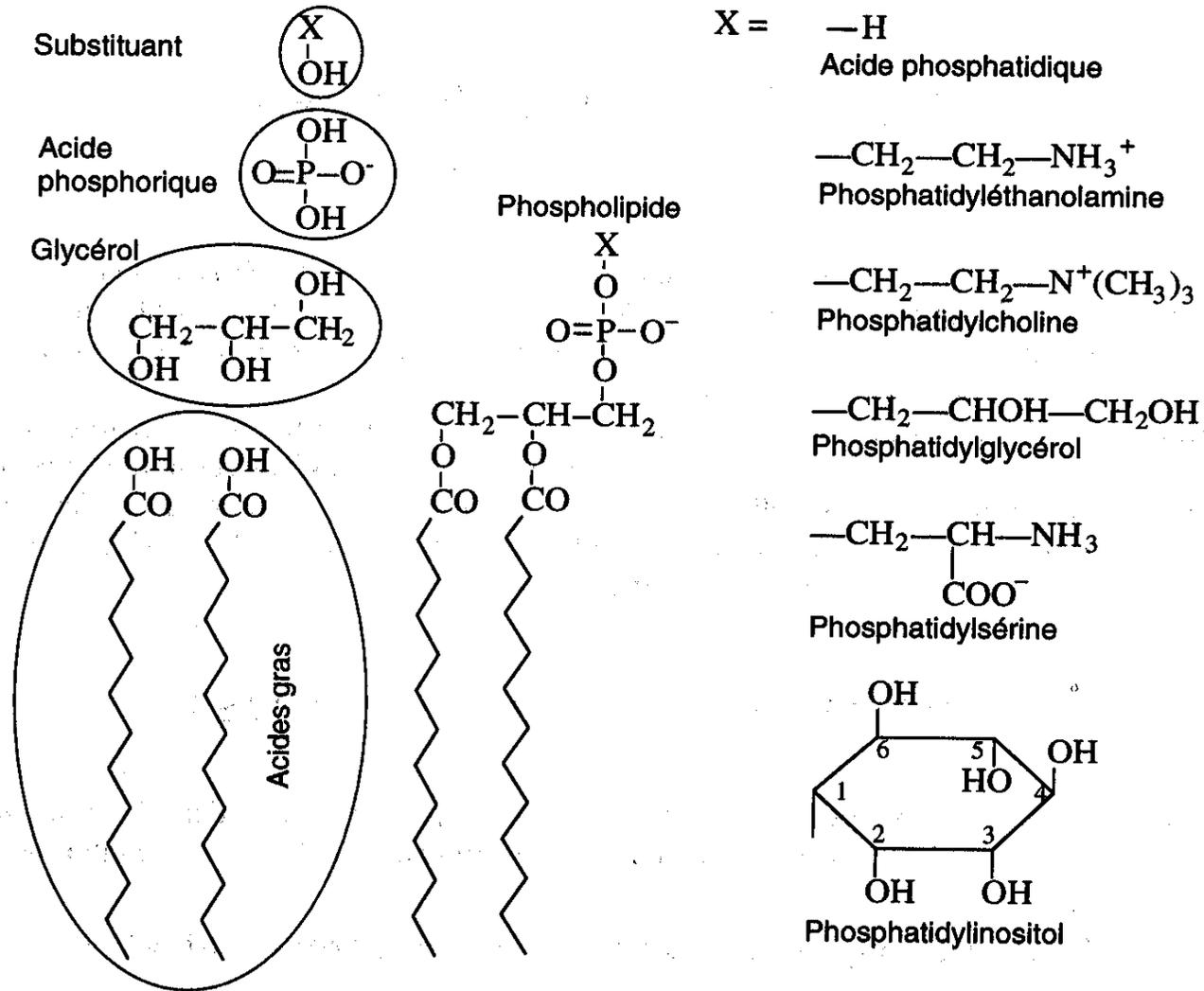


Figure 2.1. Formules de quelques phospholipides.

# Structure chimique des glycolipides et sphingolipides

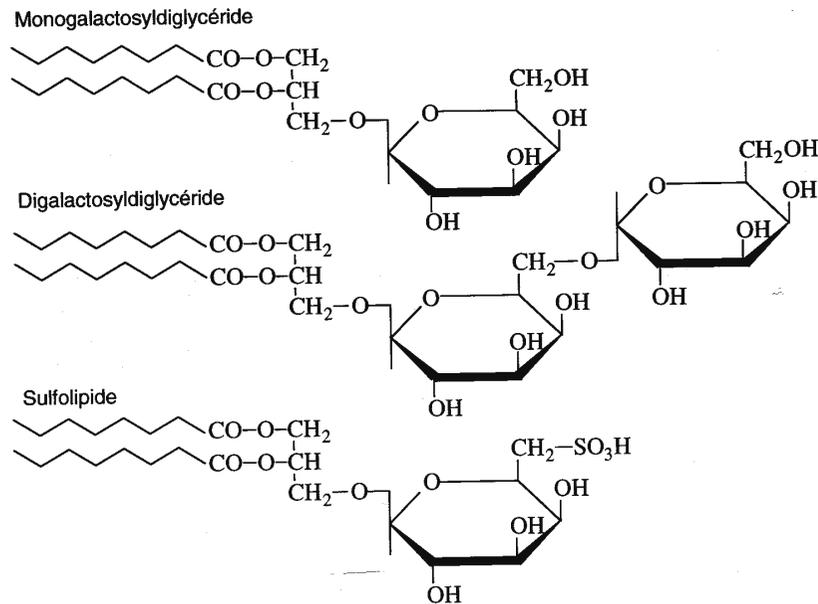


Figure 2.4. Formules de quelques glycolipides.

Les diacylphosphoglycérider dérivent du glycérol par estérification des positions 1 et 2 du glycérol par un acide gras.  
 En position 3, une liaison glycosidique associe un ou des carbohydate(s)  
 Ex : mono- et di- galactosyldiacylglycérol

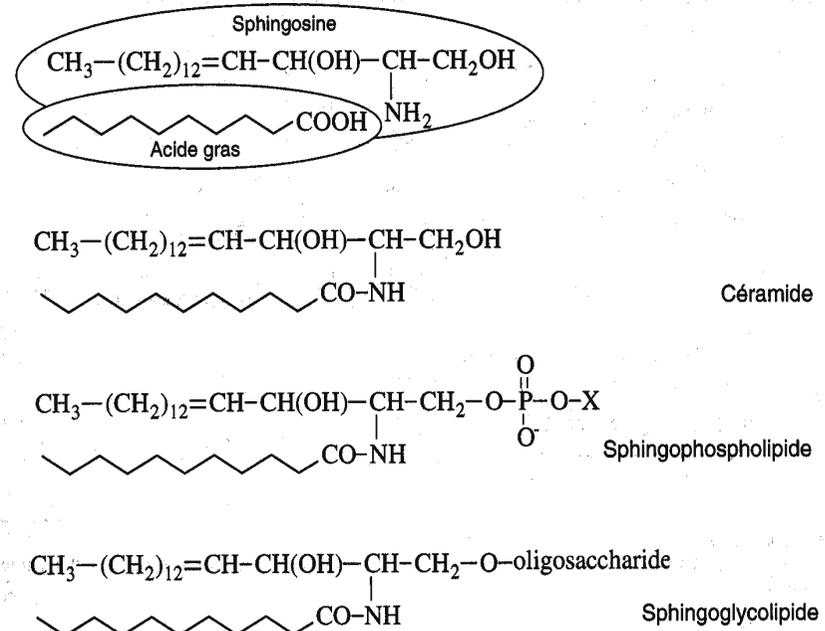


Figure 2.5. Formules de sphingolipides.

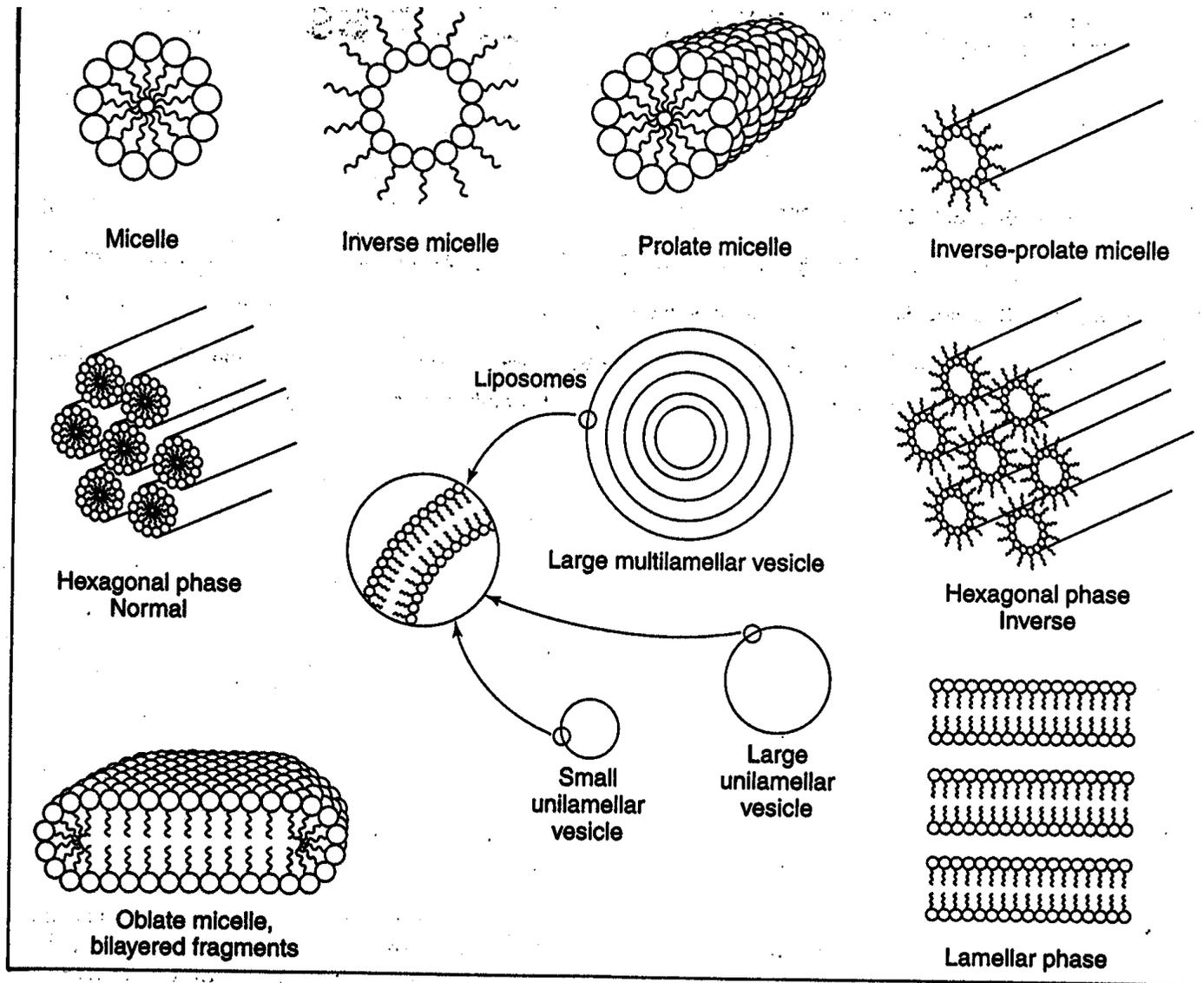
Les sphingolipides dérivent de la sphingosine. Son amidification conduit aux céramides, constituant de base des sphingophospholipides et sphingoglycolipide obtenus par addition d'un substituant sur l'alcool primaire

# Nomenclature

**Tableau 2.2.** Nomenclature et formule de quelques acides gras.

Symbole (point de fusion °C) Formule	nom systématique	nom courant
C12:0 (44,2) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -COOH	acide n-dodécanoïque	acide laurique
C14:0 (53,9) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -COOH	acide n-tétradécanoïque	acide myristique
C16:0 (63,1) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -COOH	acide hexadécanoïque	acide palmitique
C18:0 (69,6) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -COOH	acide n-octadécanoïque	acide stéarique
C20:0 (75,4) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> -COOH	acide n-eicosanoïque	acide arachidique
C22:0 (80,0) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> -COOH	acide n-docosanoïque	acide béhénique
cis Δ 9 C16:1 (-0,5) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	acide <i>cis</i> 9 hexadécénoïque	acide palmitoléïque
cis Δ 9 C18:1 (13,4) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	acide <i>cis</i> 9 octadécénoïque	acide oléïque
cis Δ 9,12 C18:2 (-5) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	acide <i>cis,cis</i> 6,9 octadécadiénoïque	acide linoléïque
cis Δ 9,12,15 C18:3 (-11) CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	acide <i>cis,cis,cis</i> 9,12,15 octadécatriénoïque	acide linoléinique
trans Δ 9 C18:1 (37) CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	acide <i>trans</i> 9 octadécénoïque	acide élaïdique
cis Δ 5,8,11,14 C20:4 CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH	acide <i>cis,cis,cis,cis</i> 5,8,11,14, eicosatétranoïque	acide arachidonique

# Fluidité des lipides : polymorphisme



# Diagramme de phase

