



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



ANNEE : 2018

THESE N° : 08

LA MEDECINE PERSONNALISEE, ENTRE THERAPIE CIBLEE ET THERAPIE GENIQUE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mr SAMINE Soufiane

Né le 19 Avril 1994 à Casablanca

Pour L'obtention du diplôme

de Docteur En Pharmacie

Mot clés : La médecine personnalisée, la thérapie ciblée, Inhibiteur de la tyrosine kinase, Anticorps monoclonaux, la thérapie génique, CRISPR – Cas 9.

Membre du jury :

Mr A. GAOUZI

Professeur de Pédiatrie

PRESIDENT

Mr A. IBRAHIMI

Professeur de Biotechnologie

RAPPORTEUR

Mme M. OUADGHIRI

Professeur de Biotechnologie

Mme N. EL HAFIDI

Professeur de Pédiatrie

JUGES

وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ ط قُلِ الرُّوحُ

مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ

إِلَّا قَلِيلًا .

صدق الله العظيم.

سورة الإسراء الآية ٨٥ ❁



UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
RABAT



DOYENS HONORAIRES :

1962 - 1969	: Professeur_Abdelmalek FARAJ
1969 - 1974	: Professeur Abdellatif BERBICH
1974 - 1981	: Professeur Bachir LAZRAK
1981 - 1989	: Professeur Taieb CHKILI
1989 - 1997	: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 - 2003	: Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 - 2013	: Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen

Professeur Mohamed ADNAOUI

Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes

Professeur Brahim LEKEHAL

Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération

Professeur Toufiq DAKKA

Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie

Professeur Jamal TAOUFIK

Secrétaire Général

Mr. Mohamed KARRA

1 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne - Clinique Royale
Anesthésie - Réanimation
Pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes

Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne - Doyen de la FMPR
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine-Interne
Gynécologie - Obstétrique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUHA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZAD Rachid
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anesthésie Réanimation- Doyen de FMPO
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique Méd. Chef Maternité des Orangers
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie- Dir. du Centre National PV Rabat
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir. du CEDOC
Directeur du Médicament

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUHA Adil
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Chirurgie Générale Doyen de FMPT
Anesthésie Réanimation
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie

Pr. FELLAT Rokaya
 Pr. GHAFIR Driss*
 Pr. JIDDANE Mohamed
 Pr. TAGHY Ahmed
 Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
 Pr. BEN RAIS Nozha
 Pr. CAOUI Malika
 Pr. CHRAIBI Abdelmjid
 Pr. EL AMRANI Sabah
 Pr. EL BARDOUNI Ahmed
 Pr. EL HASSANI My Rachid
 Pr. ERROUGANI Abdelkader
 Pr. ESSAKALI Malika
 Pr. ETTAYEBI Fouad
 Pr. HASSAM Badredine
 Pr. IFRINE Lahssan
 Pr. MAHFOUD Mustapha
 Pr. RHRAB Brahim
 Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
 Pr. ABDELHAK M'barek
 Pr. BENTAHILA Abdelali
 Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
 Pr. BERRADA Mohamed Saleh
 Pr. CHERKAoui Lalla Ouafae
 Pr. LAKHDAR Amina
 Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
 Pr. AMRAoui Mohamed
 Pr. BAIDADA Abdelaziz
 Pr. BARGACH Samir
 Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
 Pr. EL MESNAoui Abbas
 Pr. ESSAKALI HOUSSEINI Leila
 Pr. HDA Abdelhamid*
 Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
 Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
 Pr. SEFIANI Abdelaziz
 Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
 Pr. BELKACEM Rachid
 Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
 Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan

Cardiologie
 Médecine Interne
 Anatomie
 Chirurgie Générale
 Microbiologie

Radiothérapie
 Biophysique
 Biophysique
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques *Doyen de la FMPA*
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie-Orthopédie
 Radiologie
 Chirurgie Générale – *Directeur du CHIS-Rabat*
 Immunologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie – Orthopédie
 Gynécologie – Obstétrique
 Dermatologie

Urologie *Directeur Hôpital My Ismail Meknès*
 Chirurgie – Pédiatrie
 Pédiatrie
 Gynécologie – Obstétrique
 Traumatologie – Orthopédie
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie

Réanimation Médicale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Gynécologie Obstétrique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Cardiologie *Inspecteur du Service de Santé des FAR*
 Urologie
 Ophtalmologie
 Génétique
 Réanimation Médicale

Radiologie
 Chirurgie Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale

Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Pédiatrie
Radiologie
Néphrologie
Cardiologie *Directeur Hôp.Mil. d'Instruction Med V Rabat*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie *Directeur Hôp.Ar-razi Salé*
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Neurologie *Doyen de la FMP Abulcassis*
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUAMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie *Directeur Hôp. My Youssef*
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie - *Directeur Hôp.Cheikh Zaid*
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie
Neurologie

Décembre 2000

Pr.ZOHAIR ABDELLAH *

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair

ORL

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie - *Directeur Hôp. d'Enfants Rabat*
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie - *Directeur Hôpital Ibn Sina*
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique

Pr. EL HAOURI Mohamed *

Pr. FILALI ADIB Abdelhai

Pr. HAJJI Zakia

Pr. IKEN Ali

Pr. JAAFAR Abdeloihab*

Pr. KRIOULE Yamina

Pr. MABROUK Hfid*

Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*

Pr. OUJILAL Abdelilah

Pr. RACHID Khalid *

Pr. RAISS Mohamed

Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*

Pr. RHOU Hakima

Pr. SIAH Samir *

Pr. THIMOU Amal

Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan

Pr. AMRANI Mariam

Pr. BENBOUZID Mohammed Anas

Pr. BENKIRANE Ahmed*

Pr. BOULAADAS Malik

Pr. BOURAZZA Ahmed*

Pr. CHAGAR Belkacem*

Pr. CHERRADI Nadia

Pr. EL FENNI Jamal*

Pr. EL HANCHI ZAKI

Pr. EL KHORASSANI Mohamed

Pr. EL YOUNASSI Badreddine*

Pr. HACHI Hafid

Pr. JABOUIRIK Fatima

Pr. KHARMAZ Mohamed

Pr. MOUGHIL Said

Pr. OUBAAZ Abdelbarre *

Pr. TARIB Abdelilah*

Pr. TIJAMI Fouad

Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah

Pr. AL KANDRY Sif Eddine*

Pr. ALLALI Fadoua

Pr. AMAZOUZI Abdellah

Pr. AZIZ Noureddine*

Pr. BAHIRI Rachid

Pr. BARKAT Amina

Pr. BENYASS Aatif

Pr. DOUDOUH Abderrahim*

Dermatologie

Gynécologie Obstétrique

Ophthalmologie

Urologie

Traumatologie Orthopédie

Pédiatrie

Traumatologie Orthopédie

Gynécologie Obstétrique

Oto-Rhino-Laryngologie

Traumatologie Orthopédie

Chirurgie Générale

Pneumo-phtisiologie

Néphrologie

Anesthésie Réanimation

Pédiatrie

Chirurgie Générale

Ophthalmologie

Anatomie Pathologique

Oto-Rhino-Laryngologie

Gastro-Entérologie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Neurologie

Traumatologie Orthopédie

Anatomie Pathologique

Radiologie

Gynécologie Obstétrique

Pédiatrie

Cardiologie

Chirurgie Générale

Pédiatrie

Traumatologie Orthopédie

Chirurgie Cardio-Vasculaire

Ophthalmologie

Pharmacie Clinique

Chirurgie Générale

Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique

Chirurgie Générale

Rhumatologie

Ophthalmologie

Radiologie

Rhumatologie *Directeur Hôp. Al Ayachi Salé*

Pédiatrie

Cardiologie

Biophysique

Pr. EL HAMZAOUI Sakina *
 Pr. HAJJI Leila
 Pr. HESSISSEN Leila
 Pr. JIDAL Mohamed*
 Pr. LAAROUSSI Mohamed
 Pr. LYAGOUBI Mohammed
 Pr. RAGALA Abdelhak
 Pr. SBIHI Souad
 Pr. ZERAIDI Najia

AVRIL 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 Pr. AKJOUJ Said*
 Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 Pr. BENCHEIKH Razika
 Pr. BIYI Abdelhamid*
 Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 Pr. DOGHMI Nawal
 Pr. FELLAT Ibtissam
 Pr. FAROUDY Mamoun
 Pr. HARMOUCHE Hicham
 Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
 Pr. JROUNDI Laila
 Pr. KARMOUNI Tariq
 Pr. KILI Amina
 Pr. KISRA Hassan
 Pr. KISRA Mounir
 Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 Pr. MANSOURI Hamid*
 Pr. OUANASS Abderrazzak
 Pr. SAFI Soumaya*
 Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 Pr. SOUALHI Mouna
 Pr. TELLAL Saida*
 Pr. ZAHRAOUI Rachida

Décembre 2006

Pr SAIR Khalid

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
 Pr. ACHACHI Leila
 Pr. ACHOUR Abdessamad*
 Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
 Pr. AMHAJJI Larbi *
 Pr. AOUI Sarra
 Pr. BAITE Abdelouahed *
 Pr. BALOUCH Lhousaine *

Microbiologie
 Cardiologie (mise en disponibilité)
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Gynécologie Obstétrique

Rhumatologie
 Radiologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio - Vasculaire.
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie - Pédiatrique
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Pneumo - Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo - Phtisiologie

Chirurgie générale Dir. Hôp.Av.Marrakech

Réanimation médicale
 Pneumo phtisiologie
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation Directeur ERSSM
 Biochimie-chimie

Pr. BENZIANE Hamid *
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHERKAOUI Naoual *
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 Pr. EL BEKKALI Youssef *
 Pr. EL ABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid *
 Pr. ICHOU Mohamed *
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *
 Pr. LOUZI Lhoussain *
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed *
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRANI Saad *
 Pr. OUZZIF Ez zohra *
 Pr. RABHI Monsef *
 Pr. RADOUANE Bouchaïb*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine *
 Pr. SIFAT Hassan *
 Pr. TABERKANET Mustafa *
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour *
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2008

Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali *
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. AIT BENHADDOU El Hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae *

Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio-vasculaire
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologie biologique
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie-orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Chirurgie Générale

Médecine interne
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie *Directeur Hôp.des Spécialités*
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie

Pr. BOUI Mohammed *

Pr. BOUNAIM Ahmed *

Pr. BOUSSOUGA Mostapha *

Pr. CHTATA Hassan Toufik *

Pr. DOGHMI Kamal *

Pr. EL MALKI Hadj Omar

Pr. EL OUENNASS Mostapha*

Pr. ENNIBI Khalid *

Pr. FATHI Khalid

Pr. HASSIKOU Hasna *

Pr. KABBAJ Nawal

Pr. KABIRI Meryem

Pr. KARBOUBI Lamya

Pr. LAMSAOURI Jamal *

Pr. MARMADE Lahcen

Pr. MESKINI Toufik

Pr. MESSAOUDI Nezha *

Pr. MSSROURI Rahal

Pr. NASSAR Ittimade

Pr. OUKERRAJ Latifa

Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Dermatologie

Chirurgie Générale

Traumatologie-orthopédie

Chirurgie Vasculaire Périphérique

Hématologie clinique

Chirurgie Générale

Microbiologie

Médecine interne

Gynécologie obstétrique

Rhumatologie

Gastro-entérologie

Pédiatrie

Pédiatrie

Chimie Thérapeutique

Chirurgie Cardio-vasculaire

Pédiatrie

Hématologie biologique

Chirurgie Générale

Radiologie

Cardiologie

Pneumo-Phtisiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha

Pr. AMEZIANE Taoufik*

Pr. BELAGUID Abdelaziz

Pr. CHADLI Mariama*

Pr. CHEMSI Mohamed*

Pr. DAMI Abdellah*

Pr. DARBI Abdellatif*

Pr. DENDANE Mohammed Anouar

Pr. EL HAFIDI Naima

Pr. EL KHARRAS Abdennasser*

Pr. EL MAZOUZ Samir

Pr. EL SAYEGH Hachem

Pr. ERRABIH Ikram

Pr. LAMALMI Najat

Pr. MOSADIK Ahlam

Pr. MOUJAHID Mountassir*

Pr. NAZIH Mouna*

Pr. ZOUAIDIA Fouad

Decembre 2010

Pr. ZNATI Kaoutar

Anesthésie réanimation

Médecine Interne

Physiologie

Microbiologie

Médecine Aéronautique

Biochimie- Chimie

Radiologie

Chirurgie Pédiatrique

Pédiatrie

Radiologie

Chirurgie Plastique et Réparatrice

Urologie

Gastro-Entérologie

Anatomie Pathologique

Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale

Hématologie

Anatomie Pathologique

Anatomie Pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed

Chirurgie pédiatrique

Pr. ABOUELALAA Khalil *

Pr. BENCHEBBA Driss *

Pr. DRISSI Mohamed *

Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna

Pr. EL KHATTABI Abdessadek *

Pr. EL OUAZZANI Hanane *

Pr. ER-RAJI Mounir

Pr. JAHID Ahmed

Pr. MEHSSANI Jamal *

Pr. RAISSOUNI Maha *

Anesthésie Réanimation

Traumatologie-orthopédie

Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale

Médecine Interne

Pneumophtisiologie

Chirurgie Pédiatrique

Anatomie Pathologique

Psychiatrie

Cardiologie

* Enseignants Militaires

Février 2013

Pr.AHID Samir

Pr.AIT EL CADI Mina

Pr.AMRANI HANCHI Laila

Pr.AMOR Mourad

Pr.AWAB Almahdi

Pr.BELAYACHI Jihane

Pr.BELKHADIR Zakaria Houssain

Pr.BENCHEKROUN Laila

Pr.BENKIRANE Souad

Pr.BENNANA Ahmed*

Pr.BENSCHIR Mustapha *

Pr.BENYAHIA Mohammed *

Pr.BOUATIA Mustapha

Pr.BOUABID Ahmed Salim*

Pr.BOUTARBOUCH Mahjoub

Pr.CHAIB Ali *

Pr.DENDANE Tarek

Pr.DINI Nouzha *

Pr.ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali

Pr.ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa

Pr.EL FATEMI NIZARE

Pr.EL GUERROUJ Hasnae

Pr.EL HARTI Jaouad

Pr.EL JAUDI Rachid *

Pr.EL KABABRI Maria

Pr.EL KHANNOUSSI Basma

Pr.EL KHLouFI Samir

Pr.EL KORAICHI Alae

Pr.EN-NOUALI Hassane *

Pr.ERRGUIG Laila

Pr.FIKRI Meryem

Pr.GHFIR Imade

Pr.IMANE Zineb

Pr.IRAQI Hind

Pr.KABBAJ Hakima

Pr.KADIRI Mohamed *

Pharmacologie

Toxicologie

Gastro-Entérologie

Anesthésie Réanimation

Anesthésie Réanimation

Réanimation Médicale

Anesthésie Réanimation

Biochimie-Chimie

Hématologie

Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation

Néphrologie

Chimie Analytique et Bromatologie

Traumatologie orthopédie

Anatomie

Cardiologie

Réanimation Médicale

Pédiatrie

Anesthésie Réanimation

Radiologie

Neuro-chirurgie

Médecine Nucléaire

Chimie Thérapeutique

Toxicologie

Pédiatrie

Anatomie Pathologique

Anatomie

Anesthésie Réanimation

Radiologie

Physiologie

Radiologie

Médecine Nucléaire

Pédiatrie

Endocrinologie et maladies métaboliques

Microbiologie

Psychiatrie

Pr.LATIB Rachida
 Pr.MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr.MEDDAH Bouchra
 Pr.MELHAOUI Adyl
 Pr.MRABTI Hind
 Pr.NEJJARI Rachid
 Pr.OUBEJJA Houda
 Pr.OUKABLI Mohamed *
 Pr.RAHALI Younes
 Pr.RATBI Ilham
 Pr.RAHMANI Mounia
 Pr.REDA Karim *
 Pr.REGRAGUI Wafa
 Pr.RKAIN Hanan
 Pr.ROSTOM Samira
 Pr.ROUAS Lamiaa
 Pr.ROUIBAA Fedoua *
 Pr.SALIHOUN Mouna
 Pr.SAYAH Rochde
 Pr.SEDDIK Hassan *
 Pr.ZERHOUNI Hicham
 Pr.ZINE Ali *

AVRIL 2013

Pr.EL KHATIB MOHAMED KARIM *

MAI 2013

Pr.BOUSLIMAN Yassir

MARS 2014

Pr. ACHIR Abdellah
 Pr.BENCHAKROUN Mohammed *
 Pr.BOUCHIKH Mohammed
 Pr. EL KABBAJ Driss *
 Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
 Pr. HARDIZI Houyam
 Pr. HASSANI Amale *
 Pr. HERRAK Laila
 Pr. JANANE Abdellah *
 Pr. JEAIDI Anass *
 Pr. KOUACH Jaouad*
 Pr. LEMNOUER Abdelhay*
 Pr. MAKRAM Sanaa *
 Pr. OULAHYANE Rachid*
 Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
 Pr. SABRY Mohamed*
 Pr. SEKKACH Youssef*
 Pr. TAZI MOUKHA Zakia

AVRIL 2014

Pr.ZALAGH Mohammed

Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Toxicologie

Chirurgie Thoracique
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Thoracique
 Néphrologie
 Biochimie-Chimie
 Histologie- Embryologie-Cytogénétique
 Pédiatrie
 Pneumologie
 Urologie
 Hématologie Biologique
 Gynécologie-Obstétrique
 Microbiologie
 Pharmacologie
 Chirurgie Pédiatrique
 CCV
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Gynécologie-Obstétrique

ORL

PROFESSEURS AGREGES :

DECEMBRE 2014

Pr. ABILKASSEM Rachid*
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila
Pr. BEKKALI Hicham *
Pr. BENAZZOU Salma
Pr. BOUABDELLAH Mounya
Pr. BOUCHRIK Mourad*
Pr. DERRAJI Soufiane*
Pr. DOBLALI Taoufik*
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*
Pr. EL MARJANY Mohammed*
Pr. FEJJAL Nawfal
Pr. JAHIDI Mohamed*
Pr. LAKHAL Zouhair*
Pr. OUDGHIRI NEZHA
Pr. RAMI Mohamed
Pr. SABIR Maria
Pr. SBAI IDRISSE Karim*

AOUT 2015

Pr. MEZIANE Meryem
Pr. TAHRI Latifa

JANVIER 2016

Pr. BENKABBOU Amine
Pr. EL ASRI Fouad*
Pr. ERRAMI Nouredine*
Pr. NITASSI Sophia

JUIN 2017

Pr. ABI Rachid*
Pr. ASFALOU Ilyasse*
Pr. BOUAYTI ElArbi*
Pr. BOUTAYEB Saber
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim
Pr. OURAINI Saloua*
Pr. RAZINE Rachid
Pr. ZRARA Abdelhamid*

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

Dermatologie
Rhumatologie

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

Microbiologie
Cardiologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Oncologie Médicale
Oncologie Médicale
O.R.L
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Immunologie

* Enseignants Militaires

2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS/Prs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naïma	Biochimie-chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie-chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISI Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

Mise à jour le 10/10/2018
Khaled Abdellah
Chef du Service des Ressources Humaines

Dédicaces



*Louange à Dieu tout puissant,
qui m'a permis de voir ce jour tant
attendu.*

*Toutes les lettres
ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
tous les mots ne sauraient exprimer ma
gratitude, mon respect, mon amour,
ma reconnaissance...
C'est, ainsi, tout simplement que...*

Je dédie cette thèse à ...

A ma défunte très chère grand-mère FAIZ Hiba

« Mama haja »

*Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de ma grand-mère
« Mama haja », qui nous a récemment quitté.*

*Comment t'oublier ? Ta bonté reste encore gravée dans ma mémoire, tes conseils
vivent avec moi et vivront éternellement, tu étais une maman, une si merveilleuse
maman, je t'ai connu même avant de connaître ma propre mère, tu étais toujours
là pour moi, tu étais ma confidente, la première personne à prendre ma défense
même quand j'étais en tort, ma source d'affection, de tendresse, d'amour ...*

*Tu combattais toutes tes maladies avec courage et bravoure, tu souffrais en
silence, sans jamais te plaindre, un seul et unique mot sortais de ta
bouche : « Alhamdulillah ». « Mamahaja » chérie ta souffrance était énorme,
mais je pouvais rien faire à part rigoler avec toi pour te faire oublier, regarder
tous les deux tes émissions de cuisine préférées et ensuite, les préparer et les
déguster ensemble.*

*J'ai toujours adoré ta compagnie, ça me manque tellement, je donnerai tout pour
te reparler encore pour au moins une seule fois te dire à quelle point je t'aime à
quelle point tu me manques et te rassurer de ne pas t'inquiéter pour moi.*

*J' imagine quelle serait ta joie aujourd'hui, je savais déjà que tu étais si excitée,
même plus que moi que ce jour arrive, tu as même acheté des habits spécialement
pour ce jour, tu étais si fière de moi devant la famille, les voisins, en répétant
tout le temps « wliidiaywelli docteur », j'aurai voulu que tu assistes à
l'aboutissement de ces années de dur labeur, et que tu parviennes enfin à voir
« wlidek Docteur », Dieu en a décidé autrement, c'est terriblement dur de se
séparer, mais on a qu'à accepter sa volonté.*

*J'espère que, du monde qui est tien maintenant, que tu apprécies cet humble geste
comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui prie et priera toujours
pour le salut de ton âme, un fils qui ne t'oubliera jamais et veillera à appliquer
chacun de tes conseil afin de te rendre fière là où tu es.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, t'avoir en sa sainte miséricorde ! Qu'il t'accorde la
paix éternelle et t'accueille dans son paradis. Que ton âme repose en paix ...*

إِنَّا لِلّٰهِ وَإِنَّا إِلَيْهِ رَاجِعُونَ



A mon très cher grand père
KADDOURI LAHCEN « Bba Haj »

*Vous êtes un second père pour moi ; j'ai vécu mon enfance et grandi
chez vous pendant des années.*

*Merci pour toute votre aide durant ce parcours. Puisse Dieu le tout
puissant vous préserver pour vos nous, il n'y a que vous qui nous reste
après grand-mère « allah yerhemha ».*

*Puisse le grand Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder
santé, longue vie et bonheur.*

A vous je dédie ce travail.



A ma très chère mère

KADDOURI Mounia

Je dirai bien ma sœur et non seulement ma maman, celle qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Votre prière toi et ma grand-mère et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Vous avez fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Merci pour vous être sacrifiée pour que vos enfants grandissent et prospèrent. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie, au bien-être de vos enfants. Enfin ! Merci tout simplement d'être ...

MA MÈRE ...



A ma très cher père SAMINE Hassan

De tous les pères, tu es le meilleur.

*Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités
humaines, ta persévérance et perfectionnisme.*

*En témoignage de brut d'années de sacrifices, de solitudes,
d'encouragement et de prières.*

*Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos
efforts.*

En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et
mon profond amour.*

Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.



A mes deux sœurs

SAMINE Nouhaila et Lamiaa

Je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous deux mes chères sœurs.

Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler. Pour toi Nouhaila je te souhaite de réussir à intégrer le corps des pharmaciens à travers tes études biologiques, et être ici là présent un jour pour ta soutenance.

A vous mes sœurs je dédie ce travail.

A mon frère SAMINE Khaled

Je te remercie de m'avoir soutenu dans les moments difficiles, je te remercie de tout mon cœur. Merci tout simplement d'être mon frère. Je te souhaite le meilleur pour ta carrière de footballeur, tu étais doué pour ce sport depuis qu'on était tous petits, c'est dur de réaliser ses rêves, il y a toujours ces maudits obstacles, mais je sais que tu peux le faire et tu vas y arriver.

Je crois en toi et je te dédie ce travail.



A mes deux demoiselles d'honneur,

Asmaa et Wassima

A toi ma chère Asmaa tu es un ange, vraiment la personne qui m'a soutenu le plus et m'a toujours poussée vers l'avant que ce soit pour mes examens ou même ce travail, je te trouve toujours là à m'épauler pour continuer à avancer ...

Merci pour ton soutien et tes encouragements qui ont toujours été pour moi d'un grand réconfort.

Merci pour ta gentillesse, ton aussi grand cœur tout blanc et plein d'innocence et ton sens du sacrifice.

A toi Wassima, tu es pour moi une sœur et une irremplaçable amie, nous avons partagé ensemble beaucoup de moments de joie et de bonheur toi et Asmaa, tu es toujours là avec ton sourire et tes Souuuuufiane, ton sens de l'humour ainsi que tes encouragements.

Puisse Dieu nous donner une si longue vie pour et nous garder unis par ce lien d'amitié afin de pouvoir aller à nos 3 cafés comme on le faisait tout ce temps passé.

Je vous dédie ce travail en implorant le grand Dieu le tout puissant de vous accorder une longue vie plein de bonheur, de prospérité et de réussite, en vous souhaitant le brillant avenir que vous méritiez.



A tous mes amis

Un remerciement très spécial à Siham, Mehdi, Amal, Youness, Chaimaa, Younes, Driss, Mehdi Merci pour les moments de folie passées à vos côtés, toutes nos sorties nos délires qui resteront à jamais fixé dans ma mémoire et j'espère que notre amitié durera une éternité.

J'en viens aussi à mes amis et collègues, Confrères et consœurs, Meryem, Kenza, Yasser, Ali, Wahab, Mehdi, Amine, Meryem, Hakim, Ahmed, Khalil, Hamza, Youssef, Khalil, Fatima Ezzahra, Nabil, Amine Teyara, Mehdi, Biophile, Khadija, Souhail, Salma, Kenza, Issam, Anas, Nada, Meryem, Rim, Yassine, Joseph, Oumaima, Wafae, Jihane, Abir, Bouchra, Zakaria, Fouad, Yassine, Othmane, Schehrazad, Jihane, Rihan, Zineb, Ayoub, et bien d'autres encore.

Vous Etiez tous la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, où l'on a terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien moral.

Merci à vous tous.



A mes maitres de stages

Je saisis aussi cette occasion pour prononcer un mot de gratitude à l'égard Dr. EL JAI Sophia de m'avoir accueilli pour ma toute première expérience derrière le comptoir de l'officine de la pharmacie, mais aussi de garder les portes de votre pharmacie ouvertes à moi pour apprendre à n'importe quel moment. Merci pour vos conseils, votre sens de l'humour, votre sens de responsabilité et surtout l'amour que vous approuvez à votre profession, tout ceci vous me l'avez inculqué.

Mes remerciements s'étendent également à Mlle Khadija d'être tout simplement merveilleuse, avec son sens de l'humour sa « msikjiin » qu'elle ne cesse de répéter, c'était un plaisir de travailler à tes côtés.

Je saisis cette occasion pour remercier Dr. Loubna ainsi que son conjoint Mr Fouad pour la confiance qu'ils m'ont accordé, de toutes les gardes passées ensemble au beau milieu du RAMADAN, c'était juste un plaisir d'apprendre au sein de votre officine, je vous suis reconnaissant, les gens vous sont vraiment rares de nos jours.

Merci pour ce que vous aviez appris. Je vous dédie ce travail.



Enfin, j'espère du fond du cœur que tout ce petit monde, mon monde à moi, trouve ici un mot de reconnaissance, et que chacun se reconnaisse en ce qui le concerne. J'espère aussi que l'effort déployé dans le présent travail réponde aux attentes des uns et des autres.

Je suis néanmoins seul et unique responsable des oublis, des lacunes et des faiblesses que puisse contenir ce travail. Ceci étant, les propos contenus n'engagent que ma propre responsabilité.

Remerciements



A notre Maître et Rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur A. IBRAHIMI

Professeur de Biotechnologie

*Laboratoire de Biotechnologie à la Faculté de Médecine et de
Pharmacie de Rabat*

*Ce fût un grand plaisir pour moi que d'être encadré par vous tant pour
vos qualités professionnelles incontestables que pour votre soutien.*

*Malgré les prérogatives qui sont siennes, vous avez accepté sans réserve,
de diriger cette thèse. Vous y êtes grandement impliqué par vos
directives, vos remarques et suggestions, mais aussi par vos
encouragements dans les moments clés de son élaboration. Je tiens à
vous remercier aussi pour cette liberté que vous m'avez permise, sans
laquelle je ne saurais affirmer ma manière de penser et de procéder, ma
manière d'être.*

*Veillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de ma profonde
gratitude et grand respect.*



A notre Maître, Juge de thèse

*Monsieur le Professeur A. GAOUZI
Professeur de Pédiatrie
CHU IBN SINA RABAT*

*Vous nous faites l'honneur d'être parmi nos juges.
Veuillez accepter, cher Maître, L'expression de mon profond respect et
ma grande considération.*



A notre Maître, Juge de thèse

*Madame le Professeur N. EL HAFIDI
Professeur de Pédiatrie
Immuno-allergologie
Pneumologie pédiatrique*

*Vous nous faites l'honneur d'être parmi nos juges.
Nous vous sommes très reconnaissants de l'aide que vous nous avez
apportée à l'élaboration de ce travail.
Veuillez accepter, cher Maître, l'expression de mon profond respect et
ma grande considération.*



A notre Maître, Juge de thèse

*Madame le Professeur N. EL HAFIDI
Professeur de Biotechnologie
Laboratoire de Biotechnologie
A la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*Nous sommes heureux de vous compter parmi nos juges.
Puisse ce modeste travail représenter mon profond respect et témoigner
de mon estime la plus sincère*



TABLE DE MATIERE

Introduction	1
Partie 1 : Médecine personnalisée	4
1. Présentation et définition de la médecine personnalisée	5
1.1. Définition	5
1.2. Intérêt et historique	5
2. Biomarqueurs	6
2.1. Définition	6
2.2. Objectifs	7
2.3. Séquençage	8
2.3.1. Intérêt général	8
2.3.2. Définition	8
2.3.3. Historique	9
3. La variation génétique du génome humain	13
5.1. Organisation du génome humain	14
5.2. Le polymorphisme génétique	17
5.1.1. Aperçu général	17
5.1.2. Les types de polymorphismes génétiques	18
5.3. Les modifications épigénétiques	19
4. Pharmacogénomique et pharmacogénétique	20
5. Progrès scientifique et technologique à l'égard de la Médecine personnalisée	21
5.1. L'évolution des techniques de séquençage du génome	27

5.1.1.	Des méthodes de séquençage de plus en plus rapide	27
5.1.2.	Des effets à court terme sur les connaissances et à plus long terme sur les thérapeutiques.....	31
5.2.	L'usage des puces à ADN et la nano-médecine	32
5.2.1.	L'usage des puces à ADN	33
5.2.2.	L'impact du développement de la nano-médecine sur la détection, le traitement et le suivi des patients	34
5.3.	Le perfectionnement des autres instruments	35
5.3.1.	La spectrométrie de masse	35
5.3.2.	La résonance magnétique nucléaire (RMN)	35
6.	La médecine personnalisée :une réalité scientifique	36
Partie 2 : Thérapie ciblée		38
1.	Définition	39
2.	Historique	40
3.	Classifications des thérapies ciblées	41
4.1.	Les différentes classes de la thérapie ciblée et leurs modes d'action	41
4.1.1.	Les anticorps monoclonaux.....	41
4.1.1.1.	Structure protéique des anticorps	42
4.1.1.2.	Les différentes générations des anticorps monoclonaux.....	43
4.1.1.2.1.	Les anticorps monoclonaux recombinants chimériques	43
4.1.1.2.2.	Les anticorps monoclonaux recombinants humanisés	43
4.1.1.2.3.	Les anticorps monoclonaux recombinants intégralement humains	44

4.1.1.2.4. Pourquoi cette nomenclature ?	45
4.1.1.3. Les Pharmacologie des anticorps monoclonaux	45
4.1.1.2.1. Bloqueurs d'EGFR	47
4.1.1.2.2. Bloqueurs des récepteurs au VEGF	48
4.1.1.2.3. Anti-CD	49
4.1.1.2.4. Molécules d'immunothérapie	49
4.1.1.4. Toxicité.....	50
4.1.1.4.1. Principaux effets indésirables	50
4.1.2. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase	54
4.1.2.1. Définition	54
4.1.2.2. Pharmacologies des ITKs.....	56
4.1.2.2.1. Les inhibiteurs de BCR-Abl.....	56
4.1.2.2.2. Les inhibiteurs d'EGFR	58
4.1.2.2.3. Les ITK des VEGFR.....	59
4.1.2.2.4. Les inhibiteurs de B-RAF	60
4.1.2.2.5. Les inhibiteurs de JAK.....	60
4.1.2.2.6. Les inhibiteurs d'ALK.....	61
4.1.2.2.7. Les inhibiteurs de la BTK	61
4.1.2.3. Toxicité des inhibiteurs de tyrosine kinase.....	62
4.1.2.3.1. Les affections cutanéomuqueuses.....	62
4.1.2.3.2. Les affections gastro intestinales	65
4.1.2.3.3. Les troubles généraux.....	66
4.1.2.3.4. La toxicité hématologique	66

4.1.2.3.5. La toxicité cardiovasculaire	67
4.1.2.3.6. Grossesse et allaitement.....	67
4.1.2.3.7. Principales interactions médicamenteuses	67
4.1.2.4. Principaux mécanismes de résistances aux ITKs	68
4.2. Classification selon le mode d'action	69
4.2.1. Thérapie ciblée visant la cellule tumorale au niveau membranaire.	69
4.1.2.1. La famille HER	69
4.1.2.2. Kit et PDGF-R (Exemple Imatinib)	70
4.1.2.3. ALK.....	71
4.1.2.4. VEGFR	72
4.1.2.5. IGF1-R	73
4.1.2.6. HGF et son récepteur MET	74
4.2.2. Thérapie ciblée visant la voie de signalisation sous membranaire ...	74
4.2.2.1. Voie PI3K/AKT/mTOR.....	74
4.2.2.1.1. Rappel physiologique.....	74
4.2.2.1.2. Exemples	76
4.2.2.2. Voie RAF/MEK/ERK	80
4.2.2.2.1. Rappel physiologique.....	80
4.2.2.2.2. Exemples	82
4.2.2.3. Inhibiteurs protéosomes	83
4.2.3. Thérapie ciblée agissant au niveau nucléaire	86
4.2.3.1. Les cyclines	86
4.2.3.2. Kinases Aurora	87

4.2.4. Thérapie ciblée agissant sur l'environnement tumoral	88
4.2.4.1. Les antiangiogéniques	88
4.2.4.2. Les inhibiteurs métalloprotéases	89
4. Thérapie génique ciblée.....	92
Partie 3 : La biotechnologie, la thérapie génique et l'édition génétique.....	94
1. Historiques.....	95
1.1. Historique des biotechnologies.....	95
1.2. Historique des thérapies géniques	98
1.3. Historique de l'édition du génome	100
2. Définitions.....	101
2.1. Les biotechnologies	101
2.2. Les thérapies géniques.....	102
2.2.1. Définition du terme « thérapie génique ».....	102
2.2.2. La thérapie génique somatique	103
2.2.3. La thérapie génique germinale	104
2.3. Etude du génome.....	105
3. Modalités d'utilisation de la thérapie génique	105
2.1. Addition d'un gène.....	105
2.2. Réparation des gènes	106
2.3. Modification de l'expression des gènes	111
2.3.1. Extinction génique.....	111
2.3.1.1. Interférence de l'ARN	111
2.3.1.2. ARN anti-sens.....	116

2.3.1.3. Ribosomes et ADNzymes (ou désoxyribozymes).....	116
2.3.1.4. Autres molécules régulatrices	116
2.3.2. Expression forcée	117
2.3.3. Autres modifications	118
4. Modalités d'administration de la thérapie génique.....	119
3.1. In vivo.....	119
3.2. Ciblage de l'expression du transgène.....	119
3.3. Ex vivo	121
5. Les vecteurs	123
4.1. Les vecteurs viraux	123
4.1.1. Les adénovirus	124
4.1.2. Les adeno-associated virus	126
4.1.3. Les Retroviridae	127
4.1.3.1. Les rétrovirus simples	129
4.1.3.2. Les lentivirus	130
4.2. Les vecteurs non viraux.....	131
4.2.1. Les vecteurs chimiques	132
4.2.1.1. Les lipides cationiques	132
4.2.1.2. Les polymères cationiques	133
4.2.1.3. Les polymères biodégradables.....	134
4.2.1.4. Les nanotubes de carbone	135
4.2.1.5. Autres nanoparticules non virales.....	137
4.2.2. Les acides nucléiques nus	138

4.2.2.1. Micro injection	139
4.2.2.2. Gene gun	139
4.2.2.3. Techniques hydrodynamiques	139
4.2.2.4. Electroporation	140
4.2.2.5. Nucléofection	140
4.2.2.6. Sonoporation	141
4.3. Perspectives d'améliorations.....	144
4.3.1. Les nanoparticules magnétiques.....	144
4.3.2. Les systèmes transposon/transposase Sleeping beauty.....	146
4.3.3. Les aptamère.....	148
6. Edition thérapeutique du génome	149
6.1. Historique	149
6.2. La thérapie génique ciblée : Développement de nouvelles approches d'édition de génome	150
6.3. Edition du génome : Une modification ciblée du génome	152
6.3.1. Le mécanisme fondamental d'édition génomique.....	152
6.3.1.1. La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)	153
6.3.1.2. La Recombinaison homologue (HDR)	153
6.3.1.3. Rôle du cycle cellulaire dans le choix de mécanismes de réparations	154
6.3.2. Les nucléases programmables en tant qu'outils d'édition du génome	154
6.4. CRISPR CAS9 : Une technologie révolutionnaire dans l'édition du génom.....	156

6.4.1. Mécanisme d'action de système CRISPR Cas9.....	157
6.4.1.1. CRISPR Cas9 comme système de défense immunitaire bactérien	158
6.4.1.2. CRISPR Cas9 comme outil de modification ciblée du génome ...	160
6.4.2. Approches d'édition génomique par le système CRISPR/Cas9	162
6.5. Applications médicales de la technique CRISPR CAS9	165
Bibliographie	171

Liste de Figures

Figure 1 : Taux de non réponse aux traitements selon différentes classes thérapeutiques [3].....	6
Figure 2 : Impact des biomarqueurs sur la médecine personnalisée.....	7
Figure 3 : Etapes importantes de l'évolution des progrès du séquençage	12
Figure 4 : Structure primaire d'un fragment d'ADN. Les appariements entre les bases (liaisons hydrogène) sont représentés en pointillés[11].	14
Figure 5 : L'empaquetage de l'ADN dans les chromosomes. Cet empaquetage est indispensable pour faire tenir une molécule linéaire de plus d'un mètre de long dans un noyau cellulaire[11].	15
Figure 6 : Du gène à la protéine. Le gène (A) contient un ensemble de séquences qui sont transcrites en ARN messager primaire (B), mais l'ARN messager est ensuite mûré (C) et seules certaines de ces séquences seront traduites en protéines, les exons. Les extrémités 5' et 3' UTR et les introns ne seront pas traduits en protéines. Les introns sont éliminés par épissage. Ce sont des codons particuliers rencontrés sur l'ARN messager qui indiquent le début (généralement dans l'exon 1) et la fin (généralement dans le dernier exon) de la traduction[11].	17
Figure 7 :Immunothérapie : exemple des traitements anti-PD-1 et anti-PD-L1.	23
Figure 8 : Mécanisme des cellules CAR-T	25
Figure 9 : Technique de pyroséquençage.....	29
Figure 10 : Le séquençage par le MinION.....	30
Figure 11 : Principe de nanoporesequencing	31
Figure 12 : Schéma historique des enregistrements des traitements ciblés	41
Figure 13 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux et des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK)[32].....	46
Figure 14 : Représentation de l'angiogenèse et de l'action des médicaments anti-angiogéniques. La tumeur nouvellement formée est encore isolée et produit notamment du VEGF qui stimule la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Les médicaments anti-angiogéniques bloquent l'action du VEGF. Les cellules tumorales meurent alors par nécrose[32].	48
Figure 15 : Principaux mécanismes de résistance à l' imatinib : trois partenaires importants[51]	68
Figure 16 :Aberrations de la voie PI3K communes trouvées dans une variété de types de tumeurs solides.....	75

Figure 17 : Mécanisme de fonctionnement des voies RAF/MEK/ERK	81
Figure 18 : Régulation du cycle cellulaire par les cyclines-dépendants kinases (CDKs)[101].....	86
Figure 19 :Mode d'action des thérapies antiangiogéniques ciblant le vascularendothelialgrowth factor receptors (VEGFR)	90
Figure 20 : Louis PASTEUR : père de la microbiologie	96
Figure 21 : Recombinaison homologue. A : spontanée, B : Intervention d'une nucléase en doigts de Zinc[130].....	107
Figure 22 : Correspondance RVD /nucléotide.....	109
Figure 23 :Structure et mise en place des TALEN sur l'ADN[133].....	110
Figure 24 :Fonctionnement schématique du système CRISPR	111
Figure 25 :Schéma de la synthèse des microARN	112
Figure 26 :Mécanisme d'action des siARN	114
Figure 27 :Schématisation de l'expérience menée par Brown et son équipe[145]	115
Figure 28 :A. Liaisons Watson-Crick, B. Liaisons Hoogsteen[149]	117
Figure 29 :Mécanismes des systèmes « Tet Off » / « Tet On »[154]	120
Figure 30 : Concept de thérapie génique in vivo et ex vivo	122
Figure 31 :Mode de pénétration de l'adénovirus HAd5[158].....	125
Figure 32 : cycle de vie des rétrovirus	128
Figure 33 : Représentation des barrières qui limitent l'utilisation de vecteurs non viraux in vivo.....	132
Figure 34 :Combinaisons à base de nanotubes de carbone étudiées[180].....	136
Figure 35 :Schématisation de la réaction des microbulles aux ultrasons[192].	142
Figure 36 :Effets physiques de la cavitation stable[192]	143
Figure 37 :Effets physiques de la cavitation inertielle[192]	143
Figure 38 :Schématisation du fonctionnement d'un vecteur magnétique codant pour l'expression d'une protéine fluorescente	145
Figure 39 :Schématisation du fonctionnement d'un système transposon/transposase	147
Figure 40 :Mécanismes endogènes impliqués dans la réparationd'une coupure double brin de l'ADN	152
Figure 41 :Illustration des structures des nucléases : ZFNs, Talens et Crispr cas9[209]	157

Figure 42 :Mécanismes naturels des systèmes CRISPR microbiens dans l'immunité adaptative	159
Figure 43 :Illustration du détournement du système immunitaire bactérien au profit de l'édition génomique	159
Figure 44 :Schéma illustrant le mécanisme d'action de système CRISPR Cas9	160
Figure 45 :Approches Ex Vivo vs. In Vivo.....	163

Liste de tableaux

Tableau 1 : Dénomination des anticorps monoclonaux [34]	45
Tableau 2 : Principaux anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique anti-tumorale [32]	47
Tableau 3 : Principales molécules inhibitrices de Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR-Abl) [37]	57
Tableau 4 : Principales molécules inhibitrices de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	58
Tableau 5 : Principales molécules inhibitrices des récepteurs aux Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR)	59
Tableau 6 : Principales molécules inhibitrices de B Rearrangement Activated Fibrosarcoma (B-RAF)	60
Tableau 7 : Projets de thérapies géniques (environ 300) déposées en 2000 auprès des autorités américaines ou européennes [123]	100

INTRODUCTION

L'achèvement de la première version du projet du génome humain, il y a dix ans, a généré des promesses médicales et scientifiques d'une révolution dans le domaine de la santé. Depuis lors, le domaine de la génomique - l'étude scientifique des génomes, leurs séquences d'ADN complètes et l'interaction fonctionnelle de leurs gènes s'est rapidement développé pour générer rapidement des technologies capables de générer, analyser et interpréter efficacement des données dérivées du génome. Bien que les sciences génomiques aient considérablement modifié la manière dont les scientifiques abordent les questions biologiques, leur impact sur la pratique clinique semble se produire beaucoup plus lentement. Le concept de médecine personnalisée, qui représente une avancée rapide dans le domaine des soins de santé et repose sur le caractère unique de l'individu, est une des grandes aspirations du projet sur le génome humain.

Bien que ce concept ne soit pas tout à fait nouveau, de nombreux cliniciens attendent beaucoup de l'élaboration d'un diagnostic médical, d'un pronostic et d'un traitement fondés sur l'information génétique d'un individu. Cette variabilité de la santé humaine est reconnue depuis longtemps, mais ce n'est qu'avec l'avènement des sciences génomiques que les outils permettant de comprendre cette diversité deviennent disponibles.

Les progrès technologiques comme le séquençage de la nouvelle génération, l'édition du génome améliorent considérablement le diagnostic, le pronostic et la thérapie des maladies courantes ou rares, simples ou complexes, parmi lesquelles celles qui étaient chroniques ou même incurables, en permettant une évaluation de plus en plus détaillée(et dynamique) de l'ADN, de l'ARN et des protéines chez l'homme. Une partie de la vaste l'adoption et le succès de ces technologies est l'attention exquise la qualité et la précision des mesures, ce qui est crucial.

Ces nouvelles technologies et connaissances permettront à chacun d'entre nous, en tant que professionnels et consommateurs de soins de santé, de mieux maîtriser notre

avenir et de développer une approche plus stratégique et prospective de la santé. Nous nous trouvons à l'aube d'un changement profond dans la nature prédictive de la science et de la médecine et dans notre compréhension des fondements biologiques de la santé et des maladies.

A travers cette thèse, nous avons choisi un thème avant-gardiste ...

1^{ère} Partie :

La médecine
personnalisée

1. Présentation et définition de la médecine personnalisée

1.1 . Définition

Le principe de la médecine personnalisée a été développé suite aux nombreuses découvertes récentes dans le domaine de la génétique, de la pharmacogénétique et de la pharmacogénomique. De plus, l'augmentation du coût de production des médicaments récents (principalement des anticancéreux), la diminution des mises sur le marché de nouveaux médicaments et la recherche constante d'une réduction des effets secondaires sévères, qui sont de plus en plus présents et coûteux, ont poussé les industriels et les instances réglementaires, tout comme les gouvernements, à soutenir les principes de la médecine personnalisée.

1.2 . Intérêt et historique

En effet, en 2000, sur 1232 entités chimiques approuvées comme médicaments aux Etats Unis, 16 % sont associées avec des effets secondaires suffisamment sévères pour qu'une mention soit ajoutée sur l'emballage du produit [1]. Une autre étude a démontré que 1,8million de personnes ont été hospitalisées pour des effets indésirables (excluant les échecs thérapeutiques, les empoisonnements volontaires ou non et les toxicomanies) en 1994 aux Etats Unis, avec plus de 100 000 morts. Ces effets indésirables provoquent un coût pour les hôpitaux pouvant aller de 1,58 à 4 milliards de dollars par an et sont classée entre la 4ème et la6ème cause de décès aux Etats Unis[2].

De plus, de nombreux traitements montrent une efficacité limitée. L'illustration ci-dessous représente le pourcentage de personnes ne répondant pas aux traitements pour différentes classes thérapeutiques traitant des maladies chroniques [3].

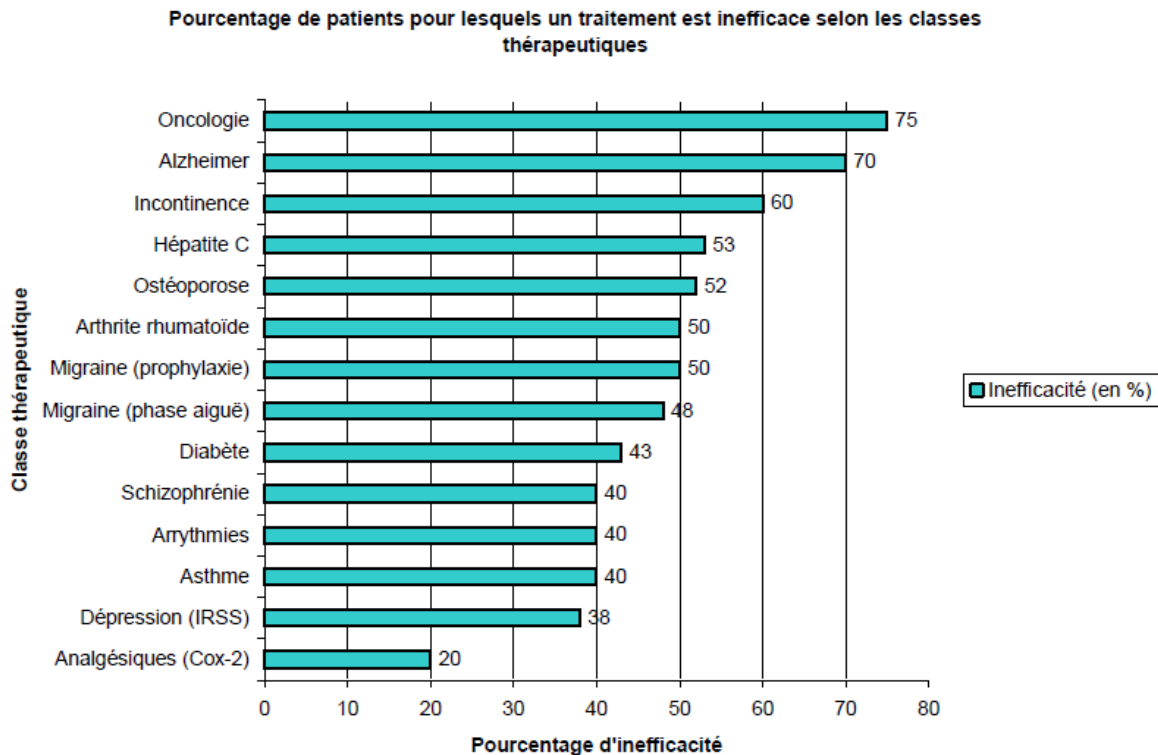


Figure 1 : Taux de non réponse aux traitements selon différentes classes thérapeutiques [3]

Sur la **Figure 1**, il est facilement identifiable que les traitements les plus anciens comme les analgésiques sont efficaces pour une grande majorité de la population alors que pour les anticancéreux ou les médicaments traitant la maladie d'Alzheimer, le pourcentage de patients chez qui la thérapie médicamenteuse est inefficace reste très élevé (70 et 75 % d'inefficacité).

2. Biomarqueurs

2.1. Définition

Un marqueur biologique (biomarqueur) est simplement une molécule qui indique une altération de la physiologie par rapport à la normale. Par exemple, toute altération moléculaire spécifique d'une cellule cancéreuse, soit sur le niveau de l'ADN, de l'ARN ou des protéines, peut être appelée biomarqueur moléculaire. Un biomarqueur est défini comme une caractéristique objectivement mesurée et évaluée en tant

qu'indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. L'expression d'un gène

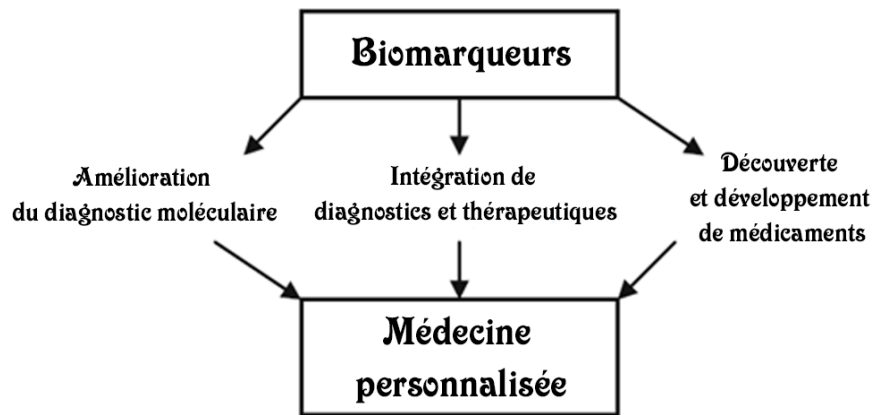


Figure 2 : Impact des biomarqueurs sur la médecine personnalisée

distinct peut permettre son identification dans un tissu sans qu'aucune des cellules environnantes n'exprime le biomarqueur spécifique. L'impact des biomarqueurs sur la médecine personnalisée est schématisé à la **Figure 2**.

2.2. Objectifs

Les technologies de diagnostic moléculaire actuellement disponibles ont été utilisées pour détecter des marqueurs biologiques de diverses maladies telles que le cancer, les troubles métaboliques, les infections et les maladies du système nerveux central. Certains des biomarqueurs récemment découverts constituent également la base de tests de diagnostic moléculaire innovants. Ceux qui concernent la médecine personnalisée peuvent être classés en tests pharmacogénétiques ou en tests pharmacogénomiques. Un test pharmacogénétique est un test destiné à étudier les variations interindividuelles de la séquence d'ADN liées à l'absorption et à l'élimination des médicaments (pharmacocinétique) ou à l'action des médicaments (pharmacodynamique), y compris la variation polymorphe des gènes des transporteurs, enzymes métabolisants, récepteurs protéines.

Un test pharmacogénomique est un test destiné à étudier les variations interindividuelles du génome entier ou du gène candidat, les SNP, les marqueurs d'haplotype ou les altérations de l'expression ou de l'inactivation de gènes susceptibles d'être corrélées à la fonction pharmacologique et à la réponse thérapeutique. Dans certains cas, le modèle ou le profil de changement est le biomarqueur pertinent, plutôt que des changements de marqueurs individuels. Les systèmes de diagnostic tels que les puces à ADN et la protéomique permettent une évaluation simultanée de plusieurs biomarqueurs. Les progrès réalisés ces dernières années suggèrent que les biomarqueurs pharmacogénomiques pourraient fournir aux médecins des informations utiles sur le plan clinique susceptibles d'améliorer les soins des patients grâce à une individualisation accrue du traitement, en particulier pour la prise en charge d'une maladie mettant la vie en danger[4].

2.3. Séquençage

2.3.1. Intérêt général

Les techniques de séquençage de l'ADN sont des outils clés dans de nombreux domaines. Un grand nombre de sciences différentes bénéficient de ces techniques, notamment l'archéologie, l'anthropologie, la génétique, la biotechnologie, la biologie moléculaire, la médecine légale. Une révolution silencieuse et remarquable est en cours dans de nombreuses disciplines. Le séquençage de l'ADN favorise de nouvelles découvertes qui révolutionnent les fondements conceptuels de nombreux champs. Parallèlement, de nouvelles questions très importantes se posent avec ces développements, telles que les questions bioéthiques et les questions liées à la santé et à la sécurité publiques [5].

2.3.2. Définition

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle - ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque

individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic (exemples : cancers, maladies infectieuses, maladies héréditaires ...), les études génétiques (structure, fonction, polymorphismes ...), l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques.

Dans de nombreuses publications, le terme séquençage peut se retrouver sous deux dénominations différentes qu'il est important de connaître. Dans les études de génomes, le terme de reséquençage (expression pouvant prêter à confusion) est utilisé à la place de séquençage. Cette dénomination, essentiellement utilisée en génétique, désigne le séquençage d'un segment d'ADN suivi de la comparaison du résultat obtenu avec celui d'une séquence de référence connue. Un autre terme est également employé : le séquençage de novo. Dans ce cas, il s'agit du séquençage d'un génome pour lequel il n'existe pas de séquence référence. Il s'agit donc de la détermination d'une séquence inconnue [6].

2.3.3. Historique

Le séquençage est un procédé chimique qui permet d'établir l'ordre dans lequel les quatre nucléotides sont enchaînés dans un brin d'ADN donné. Ce procédé, reposant sur la synthèse d'un brin d'ADN par une ADN - polymérase, a été mis au point pour la première fois en 1977. Allan Maxam, Walter Gilbert (USA) et Frederick Sanger (Royaume - Uni), les pionniers de la conquête de la séquence, ont mis au point deux méthodes très différentes, ont été décrites successivement en 1977, permettant d'accéder à la lecture de la séquence. Maxam et Gilbert ont exploité des stratégies de dégradation chimique sélective quand Sanger choisit une stratégie de synthèse enzymatique sélective. Pour ces découvertes, Gilbert et Sanger ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 1980 [7].

L'histoire ne retient effectivement que Sanger, à juste titre, puisque cette stratégie bénéficiant de l'invention de la PCR (invention de Kary Mullis publiée

en 1986 [8], lui aussi nobélisé par le prix de chimie en 1993) et du développement de l'électrophorèse capillaire, permettant de simplifier la partie séparative et analytique. La technique de Sanger a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes, tel que celui du génome humain complètement déchiffré en 2006 ou d'autres génomes, le génome bactérien, par exemple, le premier d'entre eux étant celui d'*Haemophilus influenzae*, complètement décrit en 1995[9]. Bien que les techniques de séquençage évoluent. La méthode de Sanger continue d'être la méthode de référence dans le monde à l'heure actuelle.

C'est ainsi que des sociétés comme Perkin Elmer, Beckman Coulter et Applied Biosystem ont investi dans le marché sur le même principe du séquençage Sanger sans le révolutionner mais en permettant son automatisation et l'augmentation du nombre de réactions de séquences analysables par jour. Une fois amorti, le coût de revient d'une séquence n'a cessé de baisser permettant de banaliser l'accès à celle-ci.

Se montrant de plus en plus performant, des applications comme le séquençage complet de génomes des eucaryotes supérieurs, les approches métagénomiques (nécessité de cloner), les études de modulation de transcrits (cette méthode est lourde et nécessite toujours une phase de clonage) ont connu des limites quasi infranchissables (méthodes nécessitant trop de temps et de capitaux).

Au cours de la dernière décennie, nous avons assisté au développement rapide de nouvelles technologies de séquençage et de leurs applications. Il est intéressant de noter que ces progrès ont pratiquement commencé après la fin du séquençage du génome humain. La première séquence du génome humain a été obtenue grâce à la technologie de séquençage dite de «première génération». Dans les années qui ont suivi, des technologies de séquençage (NGS) de «deuxième» ou «prochaine génération» ont été développées, caractérisées par une parallélisation massive, une automatisation et une vitesse améliorées et, surtout, un prix considérablement réduit.

Alors que les approches de «nouvelle génération» étaient améliorées, les technologies de «troisième génération» ou de «prochaine génération» sont apparues, cette fois caractérisées par le séquençage de molécules uniques (SMS). Très souvent, les expressions «séquençage profond», «séquençage parallèle massif» (MPS), «séquençage à haut débit» (HTS ou HT-Seq) sont utilisées pour les technologies de deuxième et troisième générations. Certaines de ces technologies ont été abandonnées, d'autres sont encore en cours de développement ou d'amélioration, tandis que d'autres sont désormais couramment utilisées dans les laboratoires du monde entier[10].

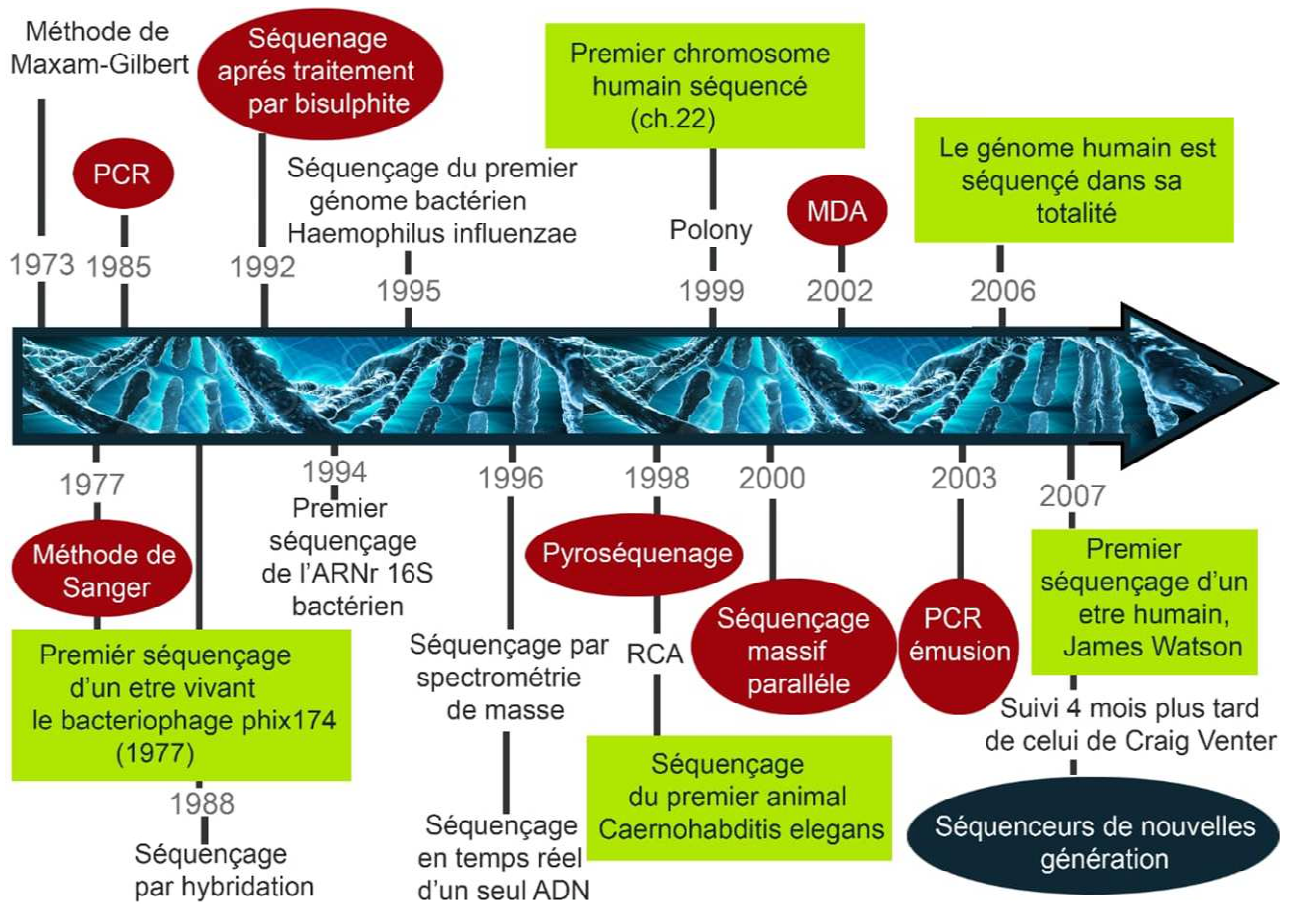


Figure 3 : Etapes importantes de l'évolution des progrès du séquençage

3. La variation génétique du génome humain

Rien n'est plus fondamental pour la biologie de l'évolution que la variation génétique. C'est parce que la variation génétique est le moteur de tout changement évolutif. La variation génétique peut être définie comme des différences héréditaires au sein ou entre les populations et les espèces. Sans ces différences héréditaires, la sélection naturelle ne peut agir. Au-delà de la sélection naturelle seule, sans variation génétique, il ne peut y avoir aucun changement au fil du temps. En bref, sans variation génétique, il ne peut y avoir d'évolution. La génétique des populations est l'étude des distributions et des changements dans la composition génétique des populations et des espèces au fil du temps. Les généticiens des populations ont mis au point de nombreux modèles mathématiques abstraits leur permettant de prédire comment la variation génétique changera dans le futur sous l'influence de différents processus évolutifs tels que la mutation, la sélection naturelle, la reproduction non aléatoire et la sélection sexuelle, la dérive génétique aléatoire, et flux de gènes entre les populations. En pratique, les généticiens des populations examinent les modèles de variation génétique existants et utilisent la théorie abstraite pour déduire comment chacun de ces processus évolutifs a pu jouer un rôle dans la formation de cette variation dans un passé récent et plus lointain. Avec cette approche, les généticiens des populations sont en mesure d'identifier des locus spécifiques sous l'influence de la sélection naturelle, en déduire les relations entre les différentes populations et espèces dans l'espace et le temps et en déduire les changements historiques de la taille des populations et des événements de dispersion sont importants pour faciliter ou limiter la divergence et l'émergence de nouvelles espèces.

Les généticiens de la population s'intéressent à tous les types de variabilité génétique et ont été à travers l'histoire. Les types de variation qui ont été utilisés par les biologistes évolutionnistes ont varié considérablement, allant de la variation morphologique à la variation chromosomique, en passant par l'évaluation de la variation au niveau des locus individuels et des analyses du génome entier. À mesure

que les techniques de génétique moléculaire ont progressé, les généticiens des populations ont également la capacité de détecter des modèles de variation génétique à des niveaux de résolution de plus en plus élevés.

5.1.. Organisation du génome humain

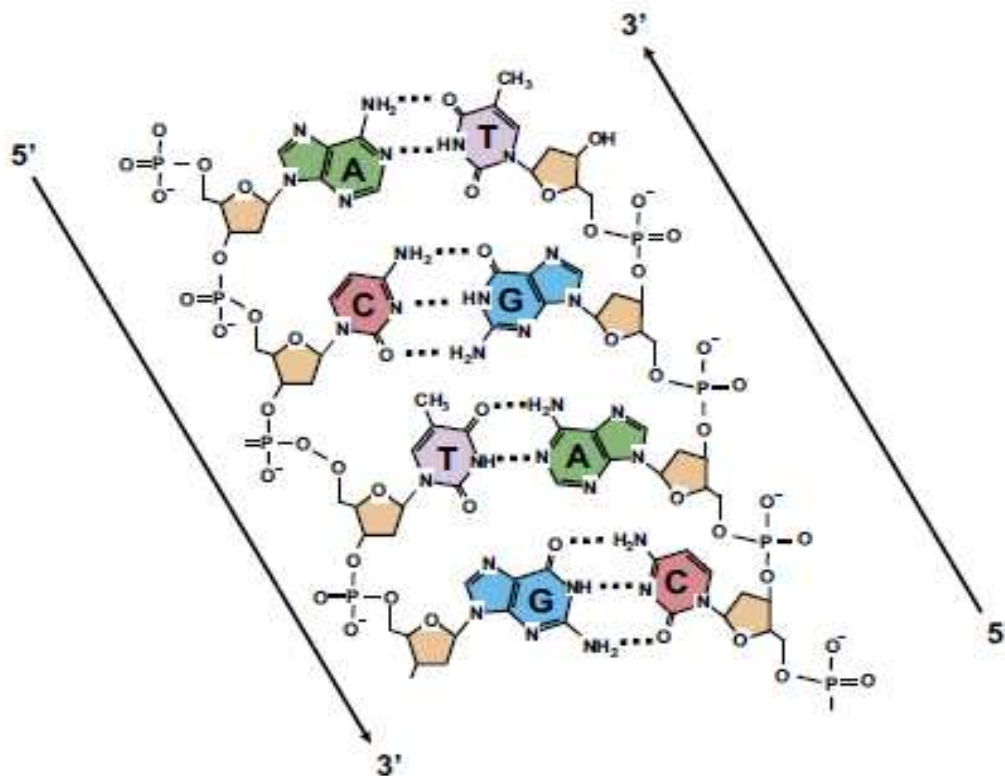


Figure 4 : Structure primaire d'un fragment d'ADN. Les appariements entre les bases (liaisons hydrogène) sont représentés en pointillés[11].

Le génome humain est constitué de deux fois 3,2 milliards de paires de nucléotides répartis en deux fois 23 chromosomes. Un rappel de la structure des nucléotides et de l'ADN est donné, il existe quatre types de bases composant les nucléotides : l'Adénine (A), la Guanine (G), la Cytosine (C) et la Thymine (T), qui s'apparient de façon complémentaire : ainsi l'adénine établit des liaisons hydrogènes avec la thymine et la cytosine avec la guanine (figure 4).

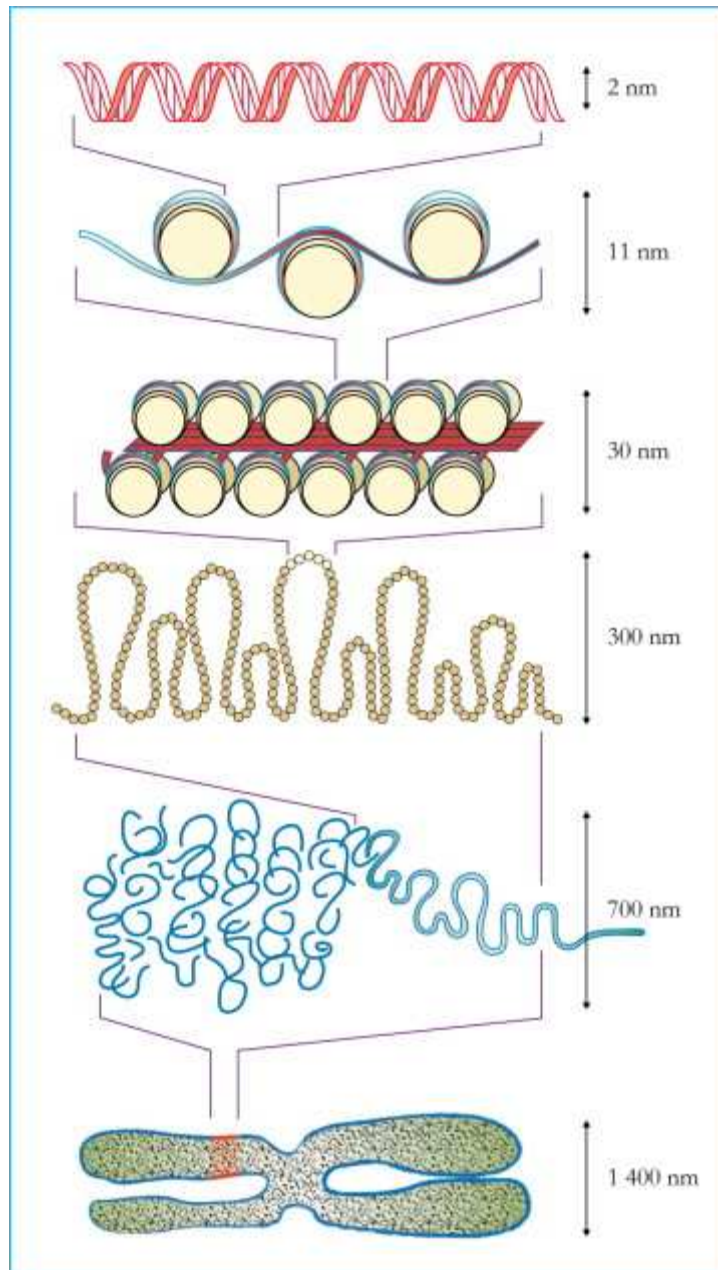


Figure 5 : L'empaquetage de l'ADN dans les chromosomes. Cet empaquetage est indispensable pour faire tenir une molécule linéaire de plus d'un mètre de long dans un noyau cellulaire[11].

Chaque chromosome contient une seule molécule d'ADN sous une forme compactée à l'extrême (figure 5). Les chromosomes ne sont identifiables que pendant la mitose, au cours de laquelle ils deviennent visibles au microscope. En dehors de la mitose, cette compaction est moindre et les chromosomes ne sont plus directement identifiables. Dans les chromosomes, l'ADN est associé à de nombreuses protéines, l'ensemble formant la chromatine. On distingue l'hétérochromatine, très compacte, qui ne peut être le siège des opérations de transcription, et l'euchromatine, plus relâchée, où peuvent se dérouler ces opérations. La chromatine est constituée de particules enchaînées linéairement, appelées nucléosomes, empilés les uns sur les autres à la manière d'un collier de perles. Chaque nucléosome est constitué d'une partie centrale cylindrique protéique autour de laquelle s'enroule l'ADN (**figure 5**). Les protéines constitutives du nucléosome sont les histones, protéines basiques interagissant avec l'ADN par des liaisons ioniques. La partie centrale du nucléosome est un octamère rassemblant deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4, l'histone H1 servant aux interactions entre nucléosomes. Les histones subissent de multiples modifications post-transcriptionnelles qui modulent leur interaction avec l'ADN et participent à la régulation de la transcription: méthylations, acétylations, phosphorylations en particulier.

Seule une partie des séquences d'ADN des chromosomes constitue les gènes et, à l'intérieur de ceux-ci, seule une partie code pour la synthèse de protéines. À proximité des séquences codantes des gènes, de nombreuses séquences régulatrices de leur transcription ont été identifiées. Il existe dans le génome, en dehors des gènes, de nombreuses séquences non codantes, dont certaines sont répétitives et dont la fonction n'est pas toujours connue.

Les gènes contiennent l'information nécessaire à la synthèse des protéines. Cette information est discontinue dans le génome eucaryote, et les séquences informatives (codantes) appelées exons, sont séparées par des séquences non informatives appelées introns. La séquence protéique sera donc déterminée par la séquence nucléotidique des

seuls exons ; toutefois, le début du premier exon et l'extrémité du dernier exon peuvent ne pas coder mais jouent un rôle régulateur. Les jonctions entre exons et introns possèdent de courtes séquences caractéristiques qui seront reconnues par la

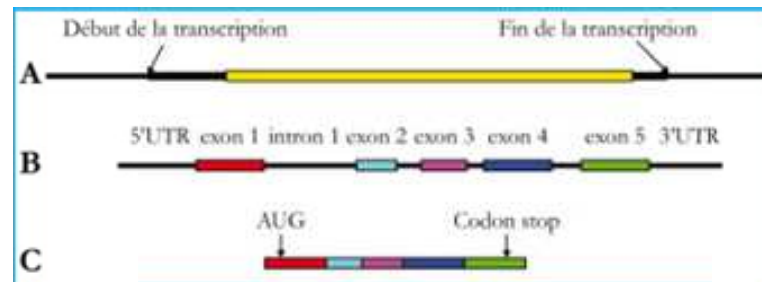


Figure 6 : Du gène à la protéine. Le gène (A) contient un ensemble de séquences qui sont transcrites en ARN messenger primaire (B), mais l'ARN messenger est ensuite mûré (C) et seules certaines de ces séquences seront traduites en protéines, les exons. Les extrémités 5' et 3' UTR et les introns ne seront pas traduits en protéines. Les introns sont éliminés par épissage. Ce sont des codons particuliers rencontrés sur l'ARN messenger qui indiquent le début (généralement dans l'exon 1) et la fin (généralement dans le dernier exon) de la traduction[11].

machinerie assurant la maturation des ARN messagers.

Les séquences régulatrices de la transcription des gènes sont localisées particulièrement en amont du premier exon, dans une région appelée promoteur. Ces séquences peuvent être reconnues par des protéines spécifiques appelées facteurs de transcription. D'autres séquences régulatrices, parfois distantes de plusieurs milliers de bases, sont appelées enhancers ou silencers. On peut les rencontrer aussi dans les introns ou en aval du dernier exon.

Notons que tous les gènes ne codent pas pour des protéines, mais pour des ARN particuliers qui ne seront pas traduits (ARN ribosomiques, ARN de transfert, micro ARN, etc.)[11].

5.2.. Le polymorphisme génétique

5.1.1. Aperçu général

Plus de 99 % du génome est commun à tous les humains. La fraction restante, bien qu'infime, est essentielle parce que les variations dans la séquence des acides

nucléiques qu'elle comporte influencent la susceptibilité aux maladies, leur expression clinique et leur évolutivité et également la réponse aux médicaments, lorsque ces variations sont localisées dans des zones critiques. Un individu porte deux allèles d'un même gène, identiques ou différents, définissant l'état constitutionnel du gène. Ces gènes peuvent présenter des variations de deux types : les polymorphismes de répétition et ceux atteignant un seul nucléotide. Les premiers qui sont les plus fréquents affectent le nombre des répétitions en tandem d'une même séquence nucléotidique, encore appelée minisatellite (dix à quinze nucléotides) ou microsatellite (un à quatre nucléotides) selon l'étendue de la répétition. Ce nombre est variable d'un individu à l'autre et se transmet héréditairement. Les polymorphismes affectant un seul nucléotide (« single nucleotide polymorphism » ou SNP) consistent en des variations de base dans un nucléotide, l'une remplaçant l'autre. Il s'y ajoute, beaucoup plus rarement, des délétions totales ou partielles du gène aboutissant à un défaut de fonction et des amplifications aboutissant à des gains de fonction. Les polymorphismes des enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques permettent de distinguer, pour un même médicament, les métaboliseurs lents (défaut d'activité), rapides (activité normale en général) et ultra-rapides (activité excessive). Dans la définition du polymorphisme génétique, s'ajoute une notion de fréquence, l'allèle le moins fréquent devant être présent dans au moins 1 % de la population [12].

5.1.2. Les types de polymorphismes génétiques

On distingue plusieurs grands types de polymorphismes :

- Le polymorphisme chromosomique, provoqué par des réarrangements de segments génomiques allant de quelques centaines de paires de bases à des chromosomes entiers, résultant de différents mécanismes (translocation, inversion, insertions/délétions, duplication).
- Le polymorphisme d'insertion, qui correspond à des éléments d'ADN mobile (transposons) répétitif qui s'insèrent dans le génome par rétro-transposition. Chez les mammifères, ces séquences sont divisées en deux principaux groupes : « long

interspersed nuclear elements » (LINE) (6 – 7 kb) et les « short interspersed nuclear elements » (SINE) (< 500 pb), qui représentent 21 et 11 % du génome humain, respectivement.

- Le polymorphisme de répétition, qui correspond à une répétition en nombre variable d'une même séquence de nucléotides : microsatellites (motif de moins de 10 pb), minisatellites (10 à 60 pb), « copy number variation » (CNV) (> 1 000 pb). Ces derniers font partie de la variation structurale du génome[13].

Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) et les variations du nombre de copies «copy number variation (CNV)» sont les principales formes de variation génétique. Le défi consiste à distinguer les variations normales des changements associés à la maladie. La combinaison d'altérations génétiques et épigénétiques, souvent avec une composante environnementale, peut causer le cancer.

La variation génomique est à la base des différences interindividuelles dans les caractères observables et la susceptibilité aux maladies. Les études génétiques sont la force motrice de la médecine personnalisée, car plusieurs des différences dans l'efficacité du traitement peuvent être attribuées à notre passé génomique.

5.3.. Les modifications épigénétiques

Le terme épigénétique a été inventé par Conrad Waddington en 1942 [14]. Au cours des années 1990, l'assimilation génétique a connu un regain d'intérêt. Ceci a conduit à l'élucidation de la base moléculaire des observations de Waddington dans lesquelles le stress environnemental a causé l'assimilation génétique de certaines caractéristiques phénotypiques chez les mouches à fruits de la drosophile. Depuis lors, les efforts de recherche se sont concentrés sur le démêlage des mécanismes épigénétiques liés à ces types de changements[15].

Alors que la génétique correspond à l'étude des gènes, l'épigénétique s'intéresse à une "couche" d'informations complémentaires qui définit comment ces gènes vont être utilisés par une cellule, ou ne pas l'être. En d'autres termes, L'épigénétique est l'étude des changements héréditaires dans l'expression des gènes (gènes actifs ou inactifs) qui

n'impliquent pas de changements dans la séquence d'ADN sous-jacente, un changement de phénotype sans changement de génotype, ce qui à son tour affecte la façon dont les cellules lisent les gènes. Le changement épigénétique est un phénomène régulier et naturel, mais il peut aussi être influencé par plusieurs facteurs, notamment l'âge, l'environnement et le mode de vie et l'état de la maladie. Les modifications épigénétiques peuvent se manifester aussi couramment que la manière dont les cellules se différencient en fin de vie pour finir sous forme de cellules cutanées, de cellules hépatiques, de cellules cérébrales, etc. Ou encore, le changement épigénétique peut avoir des effets plus dommageables qui peuvent entraîner des maladies comme le cancer[16].

Actuellement, la méthylation de l'ADN est l'une des modifications épigénétiques les plus étudiées et les mieux caractérisées, remontant aux études effectuées par Griffith et Mahler en 1969, qui suggéraient que la méthylation de l'ADN peut être importante dans la fonction de mémoire à long terme [17].

D'autres modifications majeures comprennent les modifications des histones et les mécanismes de silençage des gènes associés à l'ARN non codant (ncRNA).

4. Pharmacogénomique et pharmacogénétique

Les termes pharmacogénétique et pharmacogénomique sont souvent utilisés indifféremment, mais ils ne devraient pas l'être. Récemment, la pharmacogénétique / pharmacogénomique est devenue synonyme de «thérapie médicamenteuse individualisée», un sous-ensemble majeur dans le domaine plus large de la «médecine personnalisée».

La pharmacogénétique est définie comme «l'étude de la variabilité héréditaire de la réponse aux médicaments», ou simplement «des interactions entre les gènes et les médicaments». Les réactions aux médicaments diffèrent souvent entre les individus. Chaque personne a son propre «profil pharmacogénétique», car chacun de nous a son propre modèle de différences microsatellites, de polymorphismes mononucléotidiques ou d'empreinte digitale. Notre constitution génétique détermine en grande partie notre

réponse aux médicaments. La réponse médicamenteuse est cependant très complexe et comprend de nombreux événements associés à des différences génomiques (certaines connues, d'autres encore non comprises), de nombreux effets environnementaux (par exemple, régime alimentaire, tabagisme, interactions médicamenteuses et exposition à des produits chimiques et à d'autres polluants environnementaux), et facteurs endogènes (par exemple âge, sexe, exercice, divers états pathologiques, statut de la fonction rénale, fonction d'autres organes, etc.). La pharmacogénomique est définie comme «l'étude de la manière dont les médicaments interagissent avec le génome total pour influencer les voies et processus biologiques». Ce domaine, est le sous-produit direct du projet du génome humain, pourrait aider à identifier de nouvelles cibles médicamenteuses. Ainsi, en concevant de nouveaux médicaments[18].

5. L'immunothérapie

L'immunothérapie ne vise pas directement la tumeur. Elle agit principalement sur le système immunitaire du patient pour le rendre apte à attaquer les cellules cancéreuses. L'immunothérapie spécifique consiste à stimuler certaines cellules immunitaires pour les rendre plus efficaces ou à rendre les cellules tumorales plus reconnaissables par le système immunitaire. Elle repose sur les anticorps monoclonaux, notamment les inhibiteurs de points de contrôle, les anticorps bispécifiques, le transfert adoptif de cellules ou encore la vaccination anti-tumorale.

5.1. Le système immunitaire

Le système immunitaire a pour rôle de protéger l'organisme. Il est composé d'un ensemble de cellules, de tissus et d'organes dont la fonction est d'identifier, maîtriser et détruire les particules étrangères, comme les bactéries ou les virus, ainsi que les cellules anormales, comme les cellules cancéreuses, avant qu'elles n'affectent notre organisme.

Le système immunitaire comprend deux types de réponses :

- Une réponse immunitaire innée ou naturelle. Elle est immédiate et constitue le premier rempart de l'organisme en cas d'infection ou de maladie.

- Une réponse immunitaire adaptative ou spécifique. Elle est activée lorsque l'organisme est exposé à certaines maladies. Cette réponse spécifique est plus tardive et est adaptée à chaque agent infectieux. En cas d'attaque ou en présence de cellules anormales, des anticorps sont produits et viennent se lier à des protéines présentes à la surface de ces cellules, les antigènes. Cette reconnaissance des antigènes enclenche alors les mécanismes immunitaires pour rejeter ou détruire les cellules étrangères ou anormales. La réponse immunitaire adaptative comporte également une réponse dite « mémoire » qui permet une réaction plus rapide et plus forte en cas de nouvelle attaque par le même agent infectieux. L'immunité adaptative repose notamment sur les lymphocytes B qui produisent des anticorps spécifiques et les lymphocytes T capables de détruire les cellules anormales.

Il arrive que les cellules cancéreuses parviennent à déjouer le système immunitaire pour ne pas être reconnues comme des cellules étrangères ou anormales. Les mécanismes de défense de l'organisme sont alors incapables de cibler ces cellules tumorales qui peuvent ainsi proliférer.

5.2. Les traitements d'immunothérapie

Des traitements d'immunothérapie spécifique ont été développés pour rétablir une réponse immunitaire adaptée. Les plus couramment utilisés aujourd'hui sont les inhibiteurs de points de contrôle mais d'autres approches sont en cours de développement.

5.2.1. Les inhibiteurs de points de contrôle : déverrouiller le système immunitaire

Les cellules tumorales sont capables de détourner les dispositifs de contrôle du système immunitaire pour éviter d'être attaquées et détruites. Pour cela, la tumeur déclenche des mécanismes très précis qui inactivent les cellules immunitaires et plus particulièrement les lymphocytes T. L'organisme ne peut pas alors fournir une réponse

adaptée de l'organisme pour lutter contre les cellules cancéreuses. On dit que la tumeur « freine » le système immunitaire.

Des éléments clefs de ces mécanismes, appelés « points de contrôle » (CTLA-4, PD-1, PD-L1 entre autres) peuvent être bloqués par des traitements, appelés « inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ». Le blocage de ces freins réactive alors le système immunitaire et lui permet ainsi de lutter plus efficacement contre les cellules tumorales.

Par exemple, la liaison de la protéine PD-L1, présente sur les cellules tumorales, au récepteur PD-1 sur les lymphocytes T entraîne l'inactivation de ces derniers. En bloquant le récepteur PD-1 ou la protéine PD-L1 (avec des anti-PD-1 ou anti-PD-L1), l'inactivation des lymphocytes T est levée. Ces cellules immunitaires vont alors être en mesure de s'attaquer aux cellules tumorales.

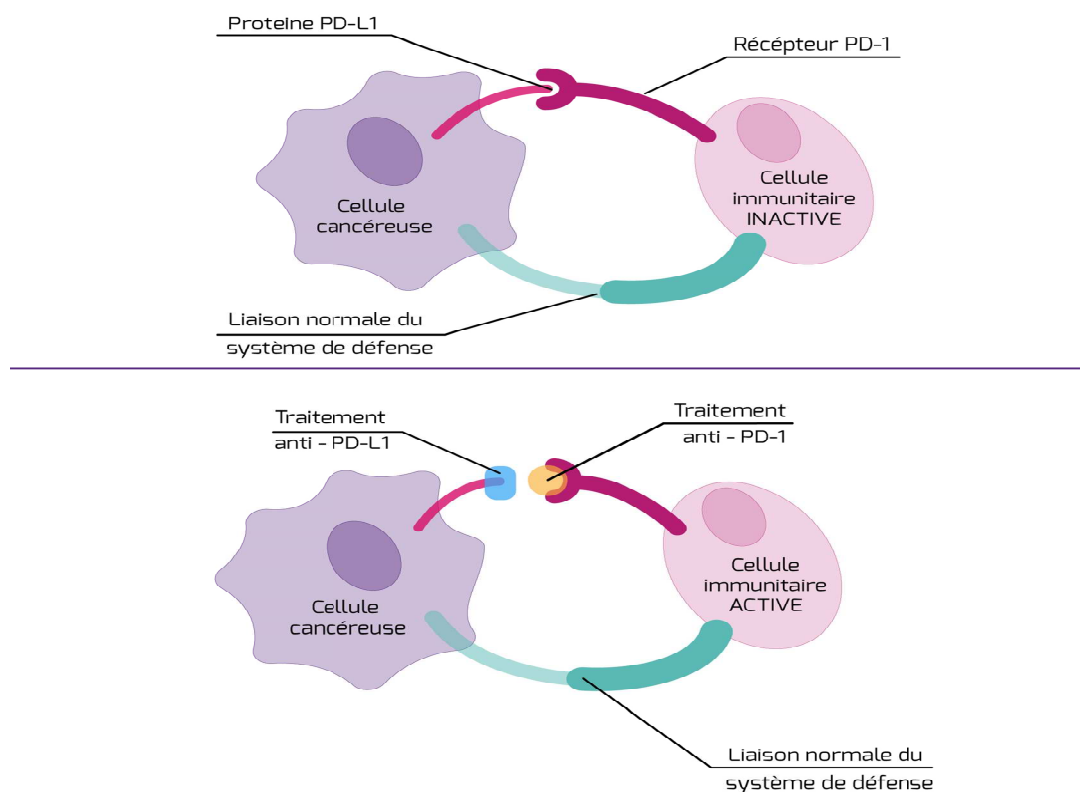


Figure 7 : Immunothérapie : exemple des traitements anti-PD-1 et anti-PD-L1

5.2.2. Les anticorps bispécifiques : rapprocher les cellules immunitaires des cellules tumorales

Les anticorps bispécifiques agissent en activant le système immunitaire pour détruire les cellules cancéreuses. Ils sont appelés bispécifiques car ils peuvent se lier à deux cellules différentes, les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires, par exemple les lymphocytes T. L'anticorps, en permettant le rapprochement de ces deux types de cellules, facilite ainsi l'élimination des cellules cancéreuses par les lymphocytes T. Le blinatumomab est le premier anticorps de cette classe. Il a été autorisé en novembre 2015 pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques.

5.2.3. Le transfert adoptif de cellules : sélectionner ou créer des cellules immunitaires plus puissantes

Des recherches portent sur d'autres approches d'immunothérapie, les thérapies cellulaires adoptives, appelées aussi transfert adoptif de cellules. Ces traitements visent à stimuler le système immunitaire du patient en donnant aux cellules immunitaires l'information dont elles ont besoin pour mieux reconnaître les cellules tumorales comme anormales et ainsi pouvoir les attaquer. Pour cela, des cellules immunitaires sont sélectionnées et/ou modifiées en laboratoire puis réinjectées dans l'organisme du patient.

Une première approche, le transfert adoptif de lymphocytes T infiltrants (TIL pour tumour-infiltrating lymphocytes), consiste à prélever des lymphocytes T d'un patient à partir d'échantillons de sa tumeur, sélectionner les plus efficaces, les cultiver en laboratoire en grand nombre, puis les lui réinjecter. Les réponses obtenues avec ces thérapies étant très variables, de nouvelles stratégies ont dû être pensées.

Une approche plus récente consiste non plus seulement à sélectionner des cellules immunitaires mais à les modifier génétiquement. Il s'agit du transfert adoptif de lymphocytes T génétiquement modifiés, appelés aussi CAR-T. Dans ce type de traitement, des cellules immunitaires, les lymphocytes T, sont prélevées dans le sang du patient puis génétiquement modifiées en laboratoire pour exprimer des récepteurs

spécifiques à leur surface. On parle de récepteur antigénique chimérique, CAR en anglais. Ces récepteurs permettront aux cellules modifiées, alors appelées CAR-T, de repérer des antigènes présents sur les cellules tumorales. Ces cellules, une fois modifiées, sont cultivées en laboratoire jusqu'à ce qu'elles prolifèrent par millions puis sont réinjectées dans le corps du patient où elles continuent de se multiplier. Grâce à leurs récepteurs, elles vont alors pouvoir reconnaître et détruire spécifiquement les cellules cancéreuses.

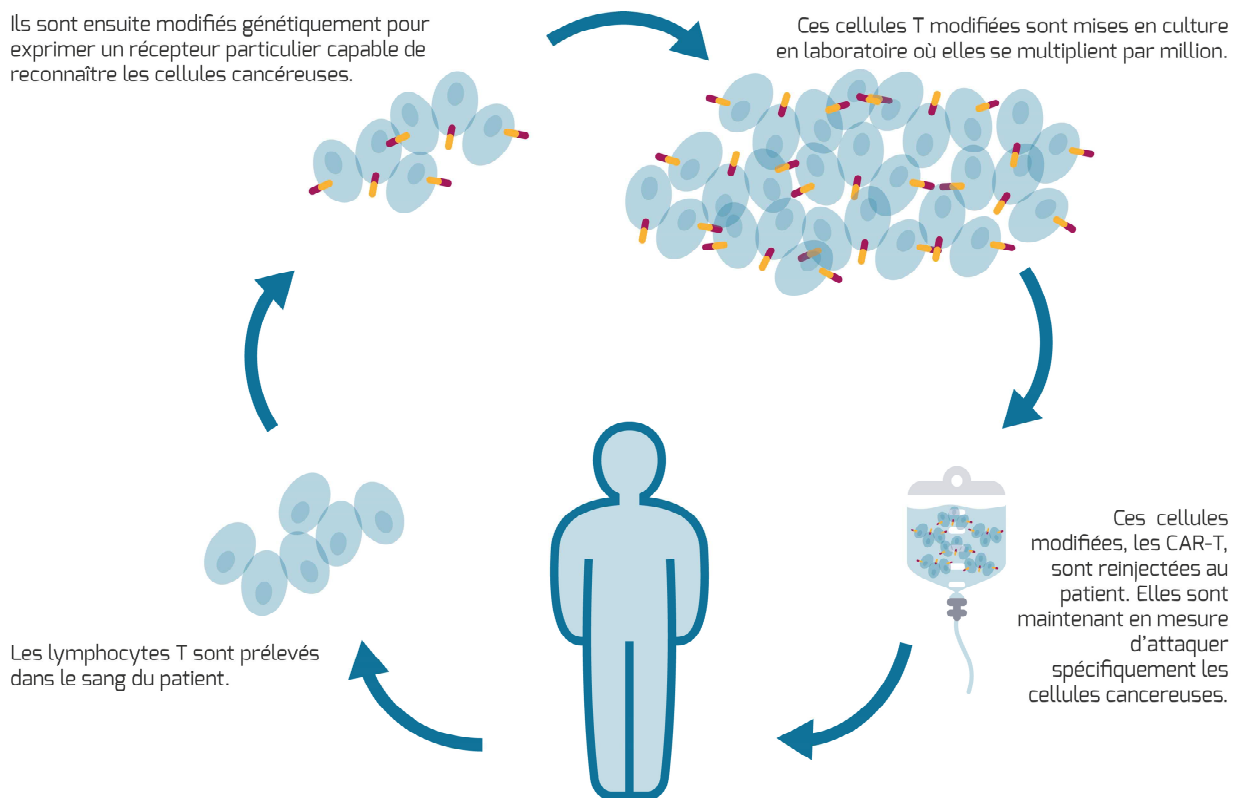


Figure 8 : Mécanisme des cellules CAR-T

Cette approche d'immunothérapie est déjà utilisée depuis quelques années, dans le cadre d'essais cliniques, pour le traitement de leucémies aiguës lymphoblastiques, notamment aux États-Unis. Malgré des résultats très encourageants dans le traitement de certaines hémopathies malignes, il reste aujourd'hui de nombreux enjeux : les résultats de ces traitements sont en effet plus modestes pour les tumeurs solides

notamment et des toxicités potentiellement très importantes ont été rapportées, plusieurs décès étant survenus au cours d'essais sur ces traitements. Des recherches sont actuellement menées pour mieux comprendre la réponse immunitaire induite par ces cellules T génétiquement modifiées et ainsi permettre une administration plus sûre de ce type de thérapies.

En France, plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours dans certaines formes de leucémies et de lymphomes. De nombreux autres essais testent également ces thérapies cellulaires dans d'autres pays et pour d'autres types de cancers.

Développer ces traitements de façon individualisée pour chaque patient étant un processus long et compliqué, certaines recherches portent maintenant sur le transfert de cellules provenant de donneurs sains et non du patient lui-même. Ces cellules ainsi « standardisées » pourraient alors être produites à l'avance et seraient donc disponibles à tout moment. Un premier essai clinique chez l'enfant, débuté mi-2016 à Londres, teste actuellement ces traitements dans la leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs B (LAL-B). Il faudra néanmoins attendre plusieurs années avant que de tels traitements soient disponibles sur le marché.

5.2.4. La vaccination thérapeutique : dresser le système immunitaire contre une cible précise

Les vaccins thérapeutiques ne visent pas à prévenir la survenue d'une maladie, comme les vaccins préventifs, mais sont conçus pour traiter, ou aider à traiter, un cancer déjà présent.

Le but de la vaccination thérapeutique est de stimuler et de diriger le système immunitaire d'un patient spécifiquement contre les cellules cancéreuses.

Différents types de vaccins thérapeutiques sont actuellement en développement ou en cours d'essais cliniques. Ces vaccins peuvent être conçus à partir de cellules cancéreuses, de fragments de cellules, d'antigènes ou encore de cellules immunitaires. Certaines vaccinations thérapeutiques, par exemple, consistent à introduire des antigènes dans le corps du patient. La reconnaissance de cet antigène entraîne une

réponse immunitaire qui va activer des lymphocytes T ou la production d'anticorps pour lutter contre les cellules porteuses de ces antigènes.

Depuis quelques années, les recherches vont plus loin en cherchant à mettre au point des vaccins personnalisés, conçus sur mesure pour chaque patient.

Pour cela, une analyse génétique de la tumeur est réalisée. Cette analyse permet d'identifier les mutations responsables de la présence de certaines protéines sur les cellules tumorales. Ces protéines, ou néo-antigènes, sont propres à chaque tumeur. Ces informations permettent de concevoir un vaccin personnalisé qui ciblera ces protéines. Une fois injecté dans le corps du patient, le vaccin permet au système immunitaire de reconnaître les cellules tumorales, porteuses de ces protéines, et stimule la production de cellules immunitaires capables de les détruire.

Concevoir des vaccins thérapeutiques efficaces est difficile et les recherches continuent. Les vaccins doivent en effet être en mesure de stimuler une réponse immunitaire contre la bonne cible et de manière suffisamment efficace pour surmonter les moyens utilisés par les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire.

6. Progrès scientifique et technologique à l'égard de la Médecine personnalisée

6.1. L'évolution des techniques de séquençage du génome

La première version du génome entier fut rendue publique en 2001. En 2006, une nouvelle technique de séquençage plus rapide a permis une utilisation pour la recherche et offert des possibilités d'application. À partir de 2006 jusqu'à nos jours des techniques sont apparues pour séquencer de plus en plus vite, et on assiste actuellement à une diversification des méthodes de séquençage qui influe sur les pratiques.

6.1.1. Des méthodes de séquençage de plus en plus rapide

C'est Frederick Sanger, deux fois lauréat du prix Nobel de chimie (1958 et 1980) qui a mis au point la première méthode de séquençage de l'ADN : la méthode Sanger, encore très employée dans le monde. Cette méthode, basée sur l'interruption de la

synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire, comporte plusieurs limites. La plus importante est son faible rendement, car les étapes de préparation de l'échantillon d'ADN et d'amplification sont lentes et coûteuses, et la taille des séquences lisibles (inférieur à 1 000 nucléotides) est limitée.

Quelque temps après la publication du premier génome humain, des machines de nouvelle génération de séquençage à haut-débit (ou sous l'acronyme « Next Génération Sequencing » NGS), bien plus rapides, ont été proposées par deux sociétés Solexa (depuis rachetée par Illumina) et 454 Life Science appartenant à Roche, marquant la première révolution du domaine [19].

Elles utilisent un séquençage massif parallèle permettant de réduire les coûts et d'augmenter la rapidité des analyses.

La compagnie 454 Life Science, a mis au point la plateforme 454, qui s'appuie sur la technique de pyroséquençage(**figure 7**), technique de séquençage par synthèse qui repose sur la détection de la libération de pyrophosphate lors de l'incorporation de nucléotides [20]. La société Solexa (Illumina) a opté pour une stratégie plus proche de la méthode de Sanger. La molécule d'ADN à séquencer est mise en présence des quatre types de nucléotides, chacun associés à un fluorophore différent. Le nucléotide nécessaire à l'élongation du brin complémentaire est alors inséré, mais une modification de sa structure empêche l'élongation de se poursuivre. Un signal lumineux spécifique du nucléotide présent est alors émis.

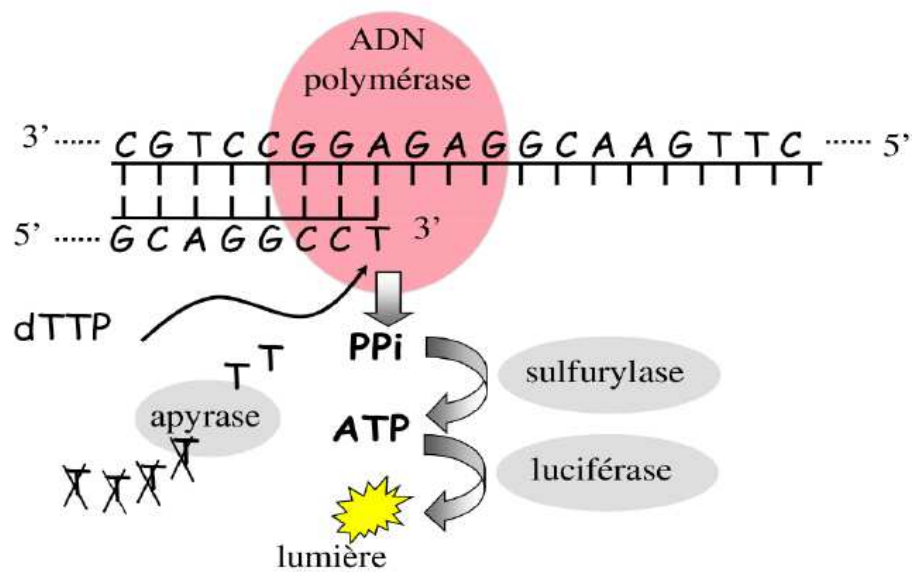


Figure 9 : Technique de pyroséquençage
[21]

Une évolution bien plus impressionnante est à l'oeuvre, la société Oxford Nanopore Technology (ONT) a présenté en 2012 un nouveau dispositif de séquençage : le MinION. La technologie de ce dispositif s'appuie sur des nanopores (un pore d'un diamètre compris entre 1 et 100 nm), ce qui comporte deux avantages : la préparation des échantillons est très simple et rapide et il sera possible de lire des dizaines de milliers de bases en une seule fois. Cependant, le taux d'erreur (4 %) reste pour l'instant trop élevé pour la plupart des applications envisagées, dont le diagnostic médical [22].

Le MinION est une grosse clé USB jetable capable de lire directement l'ADN (jusqu'à 1Gb de données) à partir d'un échantillon de sang (**figure 8**) ; il a été testé sur des génomes simples (virus, bactéries) et a démontré son efficacité en décodant leur ADN

en quelques secondes. Ce procédé, utilisé par la firme britannique, fait appel à une technique de séquençage dans laquelle les chaînes ADN traversent des micropores (2000 dans le MinION) au niveau desquels chaque nucléotide est identifié (**figure 9**).

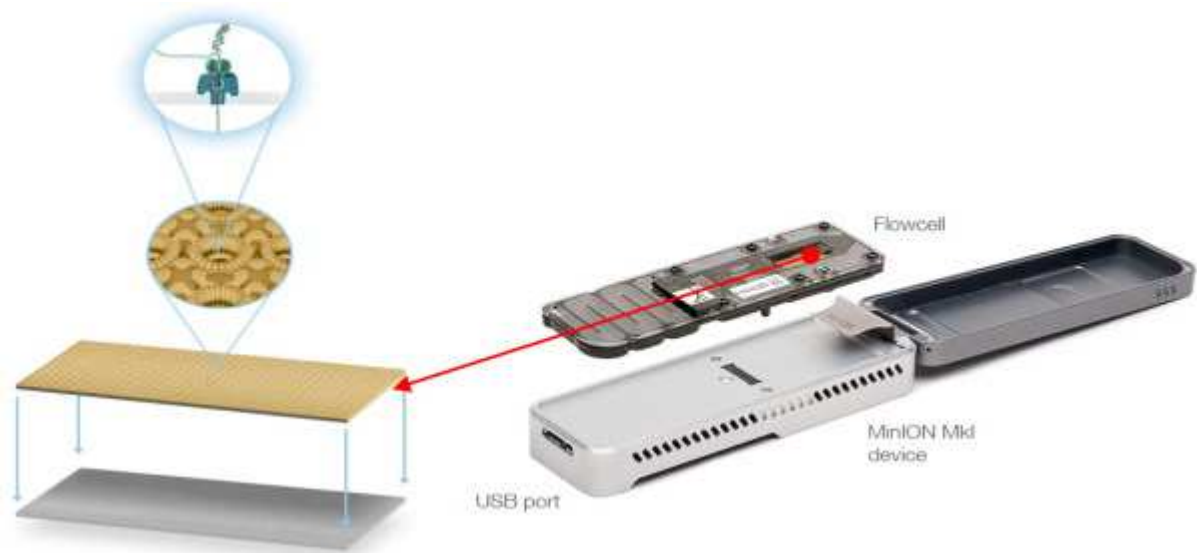


Figure 10 : Le séquençage par le MinION
[23]

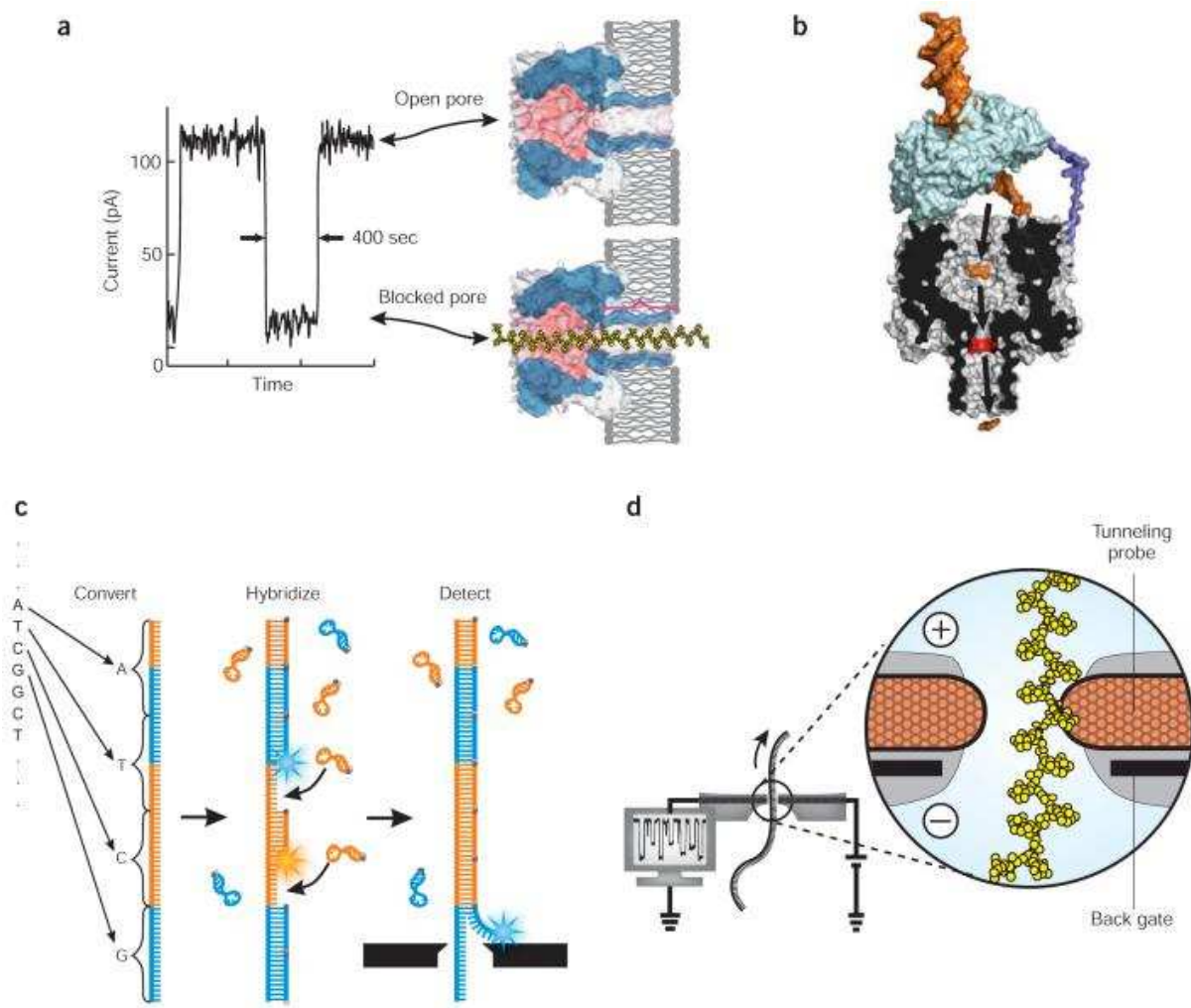


Figure 11 : Principe de nanoporesequencing

[24]

6.1.2. Des effets à court terme sur les connaissances et à plus long terme sur les thérapeutiques

Selon l'expression du Dr Laurent Alexandre « on assiste actuellement à un véritable tsunami technologique dans ce domaine. Cela ne veut pas dire que l'on va découvrir un univers génomique déterministe, cela signifie simplement que personne n'avait prévu ce qui nous arrive. En 1990, on avait un consensus mondial dans la communauté

des généticiens sur le fait qu'on ne saurait jamais séquencer intégralement les 3 milliards de paires de bases » [25].

En outre, l'on a aussi découvert que l'idée répandue depuis les années soixante-dix que 98,5 % de l'ADN ne servait à rien était erronée. Cette partie contient en réalité de nombreuses zones régulatrices très importantes qui influencent entre autres le câblage neuronal, la neuro-embryogénèse et l'immunité.

Les progrès dus au séquençage du génome humain au cours de ces dix dernières années, et à la technologie de séquençage à très haut débit ou NGS (Next Generation Sequencing) ont multiplié les capacités d'analyse par un facteur de 50 000. « On est passé presque brutalement d'un séquençage besogneux de quelques gènes pour un patient dans le cadre d'une maladie donnée, à la capacité de séquencer un très grand nombre de gènes pour un grand nombre de personnes. Cela permet d'effectuer des tests et des lectures ciblés, voire même la lecture du génome entier, ou au moins les séquences qui codent pour ces gènes » [26]. On observe un renforcement du lien entre développement du séquençage à haut débit et extension de la médecine personnalisée. Néanmoins, « il faut que toute la chaîne soit impliquée, depuis l'imagerie, les paramètres biologiques, jusqu'aux traitements », selon le Pr Florent Soubrier[27].

6.2. L'usage des puces à ADN et la nano-médecine

Les nouvelles technologies permettent des études sur le génome entier qu'il s'agisse des puces à ADN ou des méthodes de séquençage haut débit, elles ciblent en plus des gènes, des régions non codantes qui sont pour certaines, impliquées dans la pathogenèse et représentent un apport non négligeable pour comprendre les maladies pour lesquelles la cause génétique n'est pas identifiée.

Le recours à des matériaux nouveaux et aux possibilités offertes par les nanotechnologies accroissent les capacités de ciblage et de suivi des patients.

6.2.1. L'usage des puces à ADN

Pour identifier les facteurs génétiques responsables de prédispositions (ou de protection) vis-à-vis des maladies communes, on utilise des puces constituées de fragments d'ADN (oligonucléotides) correspondant à des séquences données, déposées sur un support solide selon une disposition ordonnée (array). Le fonctionnement de ces puces repose sur une hybridation par des séquences complémentaires marquées par un fluorochrome (voir figure 16). Les modèles sont basés sur des études effectuées à grande échelle (plusieurs milliers de malades et de témoins) par des études GWAS (Genome Wide Associations Studies) qui recherchent des déséquilibres de liaison entre le trait pathologique et des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) localisés dans une même région du génome.

L'évolution technique récente des puces ADN a été considérable. La miniaturisation par la technique des puces à ADN permet de mesurer et de visualiser très rapidement les différences d'expression entre les gènes et ce à l'échelle d'un génome complet. L'utilisation des puces à ADN comme outil de diagnostic présente l'avantage de faire appel à de nombreux marqueurs : plusieurs milliers de gènes peuvent être ciblés simultanément pour fournir une signature du type cellulaire étudié. Les puces à ADN permettent donc de comparer l'expression des gènes de deux types cellulaires différents, d'étudier les gènes exprimés sur un grand nombre de patients pour observer l'effet d'un médicament sur l'expression des gènes, et de comparer tissus sains contre tissus malades, traités contre non-traités, etc[28].

L'utilisation des biopuces permet en une seule expérience, qui dure environ deux jours, d'obtenir une estimation sur l'expression de plus de 30 000 gènes.

Les puces à ADN de dernière génération ont la capacité de contenir et d'analyser environ 50 000 polymorphismes. La gestion de la masse d'informations obtenues repose sur des outils informatiques puissants permettant de collecter, traiter et archiver les signaux. Ces techniques sont en évolution constante vers l'amélioration de la sensibilité, l'augmentation de la capacité et de la rapidité, et la diminution des coûts.

On peut désormais mesurer la sensibilité individuelle aux médicaments par une analyse sur le patient soit par séquençage, soit grâce à des puces à ADN, qui coûtent quelques centaines d'euros et permettent de savoir si le patient concerné réagira comme la majorité ou présentera des réactions particulières. Certaines puces à ADN sont conçues pour analyser des mutations dans certains gènes qui interviennent le plus fréquemment dans la résistance ou l'hypersensibilité à tels ou tels médicaments [29].

Ces puces sont développées en production industrielle et le passage du laboratoire à l'industrie s'est accompagné d'une amélioration de la qualité. Aux États-Unis, certaines sont accréditées uniquement pour la recherche, mais parfois utilisées par des laboratoires cliniques comme outils cliniques. La Food and Drug Administration (FDA) s'y est intéressée et l'accréditation est nécessaire.

6.2.2. L'impact du développement de la nano-médecine sur la détection, le traitement et le suivi des patients

Les nanomatériaux sont à l'échelle nanométrique, 1 000 fois plus petits qu'une cellule ; ils ont des propriétés physiques, chimiques et biologiques particulières. Les nano-dispositifs, les nano assemblages moléculaires, se trouvent donc à la même échelle de taille que les biomolécules, c'est-à-dire toutes les molécules intervenant dans des processus pathologiques. Ces dispositifs sont plus sophistiqués que les puces ADN. Ils permettent d'effectuer du séquençage à haut débit.

Les nanotechnologies innovent au niveau du diagnostic personnalisé grâce à des microsystèmes pouvant être multi-paramétrés, plus rapides, capables de traiter un plus grand nombre d'échantillons ou de travailler sur des échantillons de bien plus petite taille. Ceux-ci sont accessibles dans les laboratoires centraux, comme au lit du patient, au cabinet du médecin traitant ou dans d'autres configurations.

L'utilisation de nano-vecteurs dans les thérapies ciblées permet le transport de petites molécules médicamenteuses, après une administration veineuse, nasale ou orale, et conduisent ainsi le traitement thérapeutique au bon endroit dans l'individu et de limiter des effets secondaires délétères. Le troisième domaine d'utilisation est celui du suivi

thérapeutique, où des capteurs peuvent être portés sur la personne, voire implantés dans la personne, sachant qu'à l'échelle nanométrique ou micrométrique et nanométrique, on arrive à les réduire pour mesurer des biomarqueurs ou la variation de paramètres physiques ou physico-chimiques. Les nano assemblages ont la même taille que les particules biologiques [30].

6.3. Le perfectionnement des autres instruments

6.3.1. La spectrométrie de masse

Le principe de la spectrométrie de masse repose sur l'éventuelle fragmentation de la ou des grosses molécules (protéines) à analyser en ions qui sont ensuite séparés en fonction de leurs masses et de leurs charges. La technique ne pouvant analyser que des molécules ionisées et en phase gazeuse, son champ d'application ne concernait à l'origine que de petites molécules (sucres, acides aminés, stéroïdes, ...). Cependant, il a été ensuite considérablement élargi par la mise au point de techniques permettant de vaporiser et d'ioniser les protéines ; encore plus récemment des développements technologiques ont étendu la méthode à des échantillons solides ou à des coupes de tissus.

La puissance des logiciels informatiques couplés à ces spectromètres permet d'établir la composition en acides aminés et même leur séquence. Les principales applications de la spectrométrie de masse portent sur la « protéomique », la « métabolomique », et l'analyse des structures complexes.

C'est un moyen très utile d'analyse fine du protéome.

6.3.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) étudie des propriétés magnétiques des noyaux atomiques ; constitués de protons, neutrons entourés d'électrons, ils possèdent un moment dipolaire magnétique et un moment cinétique, responsables du phénomène de « spin ». Le moment magnétique de l'atome dépend du nombre de protons et de neutrons ; si ces deux nombres sont pairs ce moment est nul, ce qui explique que les

atomes ou leurs isotopes étudiés par RMN correspondent à des chiffres impairs dans la classification de Mendeleïev.

D'après le rapport de l'Académie nationale de médecine sur les applications médicales de ces techniques, la RMN se prête en biologie à différents types d'applications, telles que l'identification et la quantification de composés, l'analyse du mécanisme de réactions chimiques ou enzymatiques ou celle de liquides biologiques, ainsi que les mesures de distances interatomiques et la reconstitution de structures 3D ou le criblage de molécules pharmacologiques. La sensibilité de la méthode peut cependant être améliorée par l'utilisation d'une sonde cryogénique, par l'étude de deux atomes différents ou par la transformation chimique préalable des molécules à analyser, ce qui est potentiellement utilisable soit pour le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme, soit dans une approche globale dite « métabolomique » [30].

7. La médecine personnalisée : une réalité scientifique

De nombreuses modalités de médecine personnalisée reposent sur des preuves expérimentales et cliniques. Par exemple, certaines thérapies ciblées du cancer ont apporté des bénéfices thérapeutiques évidents, parfois majeurs par rapport aux chimiothérapies classiques, cytotoxiques. L'arrivée sur le marché de nouveaux principes actifs correspond à des progrès réguliers pour les patients, en termes de guérison mais surtout de survie. Il en est de même de l'application clinique de tests pharmacogénétiques ou de suivi thérapeutique pharmacologique, issus de recherches académiques. La médecine personnalisée participe également à la progression des compétences médicales, à travers les actions de formation qu'elle nécessite. Elle s'accompagne d'une progression constante des connaissances, fondamentales ou translationnelles (par ex. par l'étude des facteurs d'échappement aux thérapies ciblées qui peut permettre de découvrir de nouvelles cibles). Elle représente donc un début de réponse à la complexité.

Les enjeux scientifiques ouverts concernent les nouvelles approches de recherche de biomarqueurs telles que l'épigénétique et toutes les -omiques, mais aussi les nouveaux

outils technologiques (séquençage de nouvelle génération, nouvelles techniques d'imagerie, de spectrométrie de masse, etc.) et en particulier du traitement et du stockage des énormes masses de données qu'ils génèrent, ce qui nécessitera des investissements financiers, technologiques et humains conséquents.

La médecine personnalisée idéale repose sur le diagnostic précis des maladies, l'existence de traitement adapté pour chaque type de patients, des méthodes de choix et d'ajustement de la dose et des biomarqueurs d'efficacité, de toxicité, d'arrêt de traitement, de rechute.

La médecine stratifiée, ou de précision, utilise des biomarqueurs et des tests diagnostiques compagnons pour cibler les patients susceptibles de présenter la meilleure balance bénéfice-risque pour un traitement. Le concept de thérapie ciblée est surtout utilisé en oncologie et mériterait d'être mieux défini. Thérapies ciblées et biomarqueurs représentent des enjeux importants pour l'industrie pharmaceutique, en termes d'accès au marché, de retour sur investissement et d'image auprès des prescripteurs. Ceux qui sont disponibles aujourd'hui ne représentent probablement que la première génération de produits issus de la combinaison de la recherche clinique et de la recherche physiopathologique et moléculaire, c'est-à-dire de la recherche translationnelle[31].

2^{ème} Partie :

La thérapie
ciblée

1. Définition

Si le concept d'un médicament spécifique d'une cible en lien avec la pathologie est connu et utilisé depuis de nombreuses années dans de nombreux champs thérapeutiques (ex. hypertension artérielle, antibiothérapie...), le terme « thérapie ciblée » est plus récent, et semble être préférentiellement utilisé dans le cancer et les maladies inflammatoires chroniques, où les principes actifs antérieurs ciblaient des protéines ou des voies de signalisation ubiquitaires et peu spécifiques du processus pathologique.

Les médicaments revendiquant l'appellation de thérapies ciblées en cancérologie sont de deux types, biomédicaments et petites molécules dites « chimiques ». Les biomédicaments, issus du génie génétique et d'une production biologique, sont pour la plupart des anticorps monoclonaux, dont la dénomination commune internationale (DCI) porte le suffixe « mab », mais aussi des protéines de fusion, comportant la fraction extra-cellulaire d'un récepteur membranaire par exemple. Ils sont administrés par voie intraveineuse ou sous-cutanée, ont un poids moléculaire élevé, une longue demi-vie d'élimination, une cible généralement extracellulaire.

Les petites molécules sont principalement des inhibiteurs de voies de signalisation, représentés en particulier par les inhibiteurs de tyrosine kinases (« nib »), mais aussi par des inhibiteurs de mammalian target of rapamycin (protéine cible de la rapamycine, c'est-à-dire du sirolimus [mTOR]) ou des immuno-modulateurs. Il s'agit de molécules de faible poids moléculaire, actives par voie orale, à métabolisme hépatique ce qui ouvre souvent la voie à des interactions médicamenteuses. Leurs propriétés pharmacocinétiques sont très variables et leurs cibles peuvent être intra-cellulaires.

Sur 34 thérapies ciblées dans le cancer en 2013, 16 sont accompagnées d'un biomarqueur qui objective la cible et conditionne leurs indications. L'étude de ces 34 médicaments et la recherche de leurs points communs montrent qu'ils présentent une

ou plusieurs des 4 caractéristiques suivantes : ils sont spécifiques d'une cible moléculaire ; cette cible est une protéine qui est le plus souvent directement impliquée dans le processus pathologique ; il existe souvent un biomarqueur permettant la sélection des patients pouvant bénéficier du traitement ; la population cible est le plus souvent beaucoup plus petite que la population atteinte de la pathologie.

Toutefois, certaines thérapies « ciblées » ne remplissent qu'un seul de ces 4 critères, comme par exemple le rituximab un anticorps déplétant les lymphocytes B, qu'ils soient normaux ou blastiques, ou l'évérolimus qui n'est désigné comme thérapie ciblée que dans le traitement du cancer, mais pas dans ses deux autres indications que sont la transplantation d'organes (indication principale) et la sclérose tubéreuse de Bourneville.

A l'inverse, des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs spécifiques de voies de signalisation existent dans de nombreux autres champs thérapeutiques, sans qu'ils soient appelés « thérapies ciblées » [31].

2. Historique

A la fin des années 80, les progrès en biologie moléculaire et en génétique ont permis d'obtenir de nouvelles données sur les mécanismes de l'oncogenèse. Ces progrès ont montré que la prolifération des cellules cancéreuses, l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la formation des métastases sont des processus régulés par un réseau complexe de signaux cellulaires impliquant un grand nombre de protéines. La recherche a pu mettre en évidence que de nombreux oncogènes codent pour des protéines kinases. Au début des années 90 commence alors l'ère de la thérapie ciblée avec l'explosion du nombre de cibles thérapeutiques découvertes. En 2001, les études de Brian Druker aboutissent à la mise sur le marché du **Glivec® (Imatinibmésylate)** pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique.

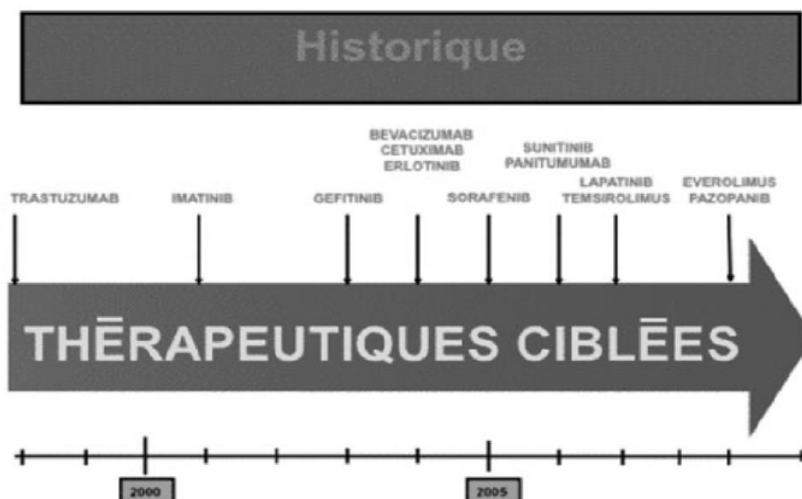


Figure 12 : Schéma historique des enregistrements des traitements ciblés

C'est le premier médicament dirigé contre une protéine kinase spécifique des cellules tumorales. Il marque le début de la thérapie ciblée dans les traitements antinéoplasiques. En 2004, la FDA approuve le premier anticorps monoclonal **Avastin® (Bevacizumab)** utilisé en thérapie ciblée pour le traitement du cancer du côlon. D'autres médicaments de type anticorps monoclonaux ou petites molécules inhibitrices de protéines kinases, sont utilisés actuellement en clinique avec succès. Pour éclaircir ce réseau complexe d'interactions cellulaires, la suite de ce chapitre décrit les principales cibles thérapeutiques anticancéreuses actuellement en cours d'investigation ou validées par le développement d'un médicament.

3. Classifications des thérapies ciblées

4.1. Les différentes classes de la thérapie ciblée et leurs modes d'action

4.1.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont les premières thérapies ciblées à avoir été mises sur le marché, à la fin des années 1990. Indiquées dans des formes avancées de cancer, ces molécules, non disponibles dans le circuit officinal, ont permis la mise au point de

nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur le traitement de l'angiogenèse, processus majeur de la tumorigenèse permettant d'irriguer les tumeurs [32].

4.1.1.1. Structure protéique des anticorps

Les anticorps sont des protéines hétérodimères composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères reliées par des ponts disulfure. Les deux chaînes légères contiennent chacune une région variable (VL) et une région constante (CL), tandis que chaque chaîne lourde contient une région variable (VH) et jusqu'à trois régions constantes distinctes (CH1 à -3) (Figure 50-1). . L'utilisation différentielle des domaines CH peut être utilisée pour classer les anticorps en cinq groupes principaux ou isotypes: IgD, IgA, IgG, IgM et IgE. Par exemple, IgM utilise des domaines constants de chaîne lourde du gène CH μ , alors que IgG utilise le gène CH γ . L'IgG est l'isotype le plus couramment utilisé en immunothérapie du cancer et est au centre de ce chapitre. Structuellement, les anticorps peuvent être divisés en deux modalités fonctionnelles: le fragment de liaison à l'antigène (Fab) et le fragment de cristallisation (Fc). Le Fab est responsable de la liaison à l'antigène et se compose de la chaîne légère de pleine longueur (VL + CL) et des domaines VH et CH1 de la chaîne lourde. Les domaines VL et VH, collectivement désignés sous le nom de fragment variable (Fv), contiennent six régions hypervariables appelées régions de détermination complémentaires (CDR). La poche de liaison à l'antigène, également appelée paratope, est formée par l'opposition de trois CDR situées sur le domaine VL (CDR-L1, -L2, -L3) et de trois CDR situées sur le domaine VH (CDR-H1, -H2, -H3). Le paratope de l'anticorps se lie à une petite région d'environ cinq à huit acides aminés de l'antigène appelé épitope. Un système complexe de recombinaisons et de réarrangements génétiques est responsable de la diversité des séquences de CDR, donnant lieu à un répertoire d'anticorps humains comprenant entre 10¹⁰ et 10¹¹ paratopes distincts[33].

4.1.1.2. Les différentes générations des anticorps monoclonaux

4.1.1.2.1. Les anticorps monoclonaux recombinants chimériques

Le développement d'anticorps chimériques sont caractérisés dans la nomenclature par le suffixe « -ximab » : ils sont constitués de régions variables murines et de régions constantes humaines. La fusion entre les régions s'opère au niveau de l'ADN, ce qui nécessite ensuite de faire exprimer les plasmides codant les chaînes lourdes et légères recomposées par des cellules transfectées (cellules de mammifères) : les anticorps monoclonaux sont devenus des anticorps recombinants. Le premier anticorps de ce type a été commercialisé en 1995 : c'est l'**abciximab(Reopro®)**, qui est en fait un fragment Fab chimérique dirigé contre le CD41 (glycoprotéine IIb de la membrane plaquettaire). L'**abciximab**, qui inhibe l'agrégation plaquettaire, est indiqué dans l'angor instable et dans la prévention des complications cardiaques ischémiques pouvant résulter des interventions coronariennes percutanées.

4.1.1.2.2. Les anticorps monoclonaux recombinants humanisés

Comme cela a clairement été montré avec l'**infiximab**, certains patients traités par anticorps monoclonaux chimériques développent des anticorps dirigés contre la partie murine des anticorps administrés (**HACA, Human Anti-Chimaeric Antibodies**). Ceci a deux conséquences néfastes : (a) une diminution très importante des concentrations sériques et de l'efficacité clinique de l'**infiximab** en raison de la formation de complexes infiximabanticorps induits et la survenue de réactions d'intolérance lors des injections d'**infiximab**. Dans l'espoir de réduire cette immunogénicité, des anticorps monoclonaux présentant un plus grand degré d'humanisation des régions variables ont été développés : ce sont les anticorps dits « humanisés » et caractérisés par le suffixe « -zumab ». L'obtention de ces anticorps de deuxième génération est complexe car les séquences codant les régions murines déterminant la complémentarité avec l'antigène doivent être greffées sur des séquences codant des régions charpentes des domaines variables humains, tout en préservant leur structure et donc les propriétés de liaison à l'antigène (affinité et spécificité)[34].

4.1.1.2.3. Les anticorps monoclonaux recombinants intégralement humains

En poursuivant dans la logique de réduire toujours plus l'immunogénicité des anticorps, les firmes se sont attelées à produire des anticorps monoclonaux intégralement humains (« fullyhuman »), qui constituent la troisième génération des anticorps recombinants. Hormis quelques rares situations où il est possible de partir des séquences d'anticorps provenant de patients (anticorps anti-rhésus, anti-agents infectieux), deux approches permettent de produire ces anticorps : le criblage de banques de phages exprimant un vaste répertoire reconstitué d'anticorps (réassociation au hasard de régions VH et VL d'immunoglobulines provenant de nombreux individus, sains ou malades), et l'immunisation de souris dont les gènes d'immunoglobulines ont été remplacés par des gènes d'immunoglobulines humains (par exemple **Xenomouse**), ce qui permet de cribler directement les anticorps à partir des hybridomes. Cependant, la production de ces anticorps repose sur une technologie recombinante, après clonage des gènes des immunoglobulines. Le criblage de banques de phages nécessite souvent, quant à lui, une étape supplémentaire de maturation d'affinité. Cette maturation consiste à mimer le processus naturel, en générant des anticorps ciblant un antigène particulier, puis à sélectionner ceux dont l'affinité est la plus grande. Ces techniques, très récentes, ont déjà permis la mise sur le marché, en 2003, de l'**adalimumab(Humira®)**, un anticorps intégralement humain anti-TNF α , indiqué dans la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn, puis dans la spondylarthrite ankylosante et le rhumatisme psoriasique (extension d'AMM 2006). Le dernier anticorps intégralement humain ayant obtenu une autorisation de mise sur marché est le **panitumumab(Vectibix®)**, un autre anticorps dirigé contre l'EGFR et indiqué dans le cancer colorectal (2007).

4.1.1.2.4. Pourquoi cette nomenclature ?

Même si les règles présidant à déterminer les dénominations communes des anticorps, avec différents suffixes (**tableau 1**) entérinent la classification des anticorps en trois générations, celle-ci ne traduit pas véritablement de différence thérapeutique.

En effet, même intégralement humain, tout anticorps possède par nature un idiotype (sa partie hypervariable se fixant sur un épitope de l'antigène), séquence d'acides aminés totalement originale pour l'organisme et donc potentiellement immunogène.

Il n'est donc pas surprenant que des patients développent des anticorps anti-idiotype neutralisants (également appelés « **Human Anti-HumanAntibodies** » : **HAHA**) lors de l'administration d'anticorps intégralement humains [34].

Tableau 1 : Dénomination des anticorps monoclonaux[34]

Antépénultième syllabe		Avant-dernière syllabe		Dernière syllabe
Maladie ou système cible		Génération d'anticorps		Abréviation de : « Monoclonal AntiBody »
tu	Cancer			
li(m)	Système immunitaire	mo	Murin	
ci(r)	Système cardiovasculaire	xi	Chimérique	
vi(r)	Virus	zu	Humanisé	mab
le(s)	Lésions infectieuses	mu	Humain	
bac	Bactérie			

4.1.1.3. Les Pharmacologie des anticorps monoclonaux

S'agissant des anticorps monoclonaux, la stratégie de ciblage est extracellulaire, par le blocage d'un ligand ou d'un domaine extracellulaire d'un récepteur, ou encore par la reconnaissance d'un antigène de surface (**Figure 10**). Ce ciblage est permis grâce à un anticorps monoclonal qui n'a pas la capacité d'être internalisé dans la cellule et qui, dans la majorité des cas, est administré par voie parentérale. Selon la structure de

l'anticorps, ce dernier pourra exercer des propriétés cytolytique (**rituximab**, par exemple), antagoniste (**cétuximab** entre autres) ou neutralisante (**bévacizumab** notamment). Ces anticorps, non disponibles dans le circuit officinal, présentent différentes cibles pharmacologiques impliquées, pour la plupart, dans la régulation de l'angiogenèse.

Comme toutes thérapies ciblées, les anticorps monoclonaux sont utilisés en seconde ligne, après échec d'une chimiothérapie cytotoxique ou en association avec des chimiothérapies sur des tumeurs cancéreuses métastasées[32].

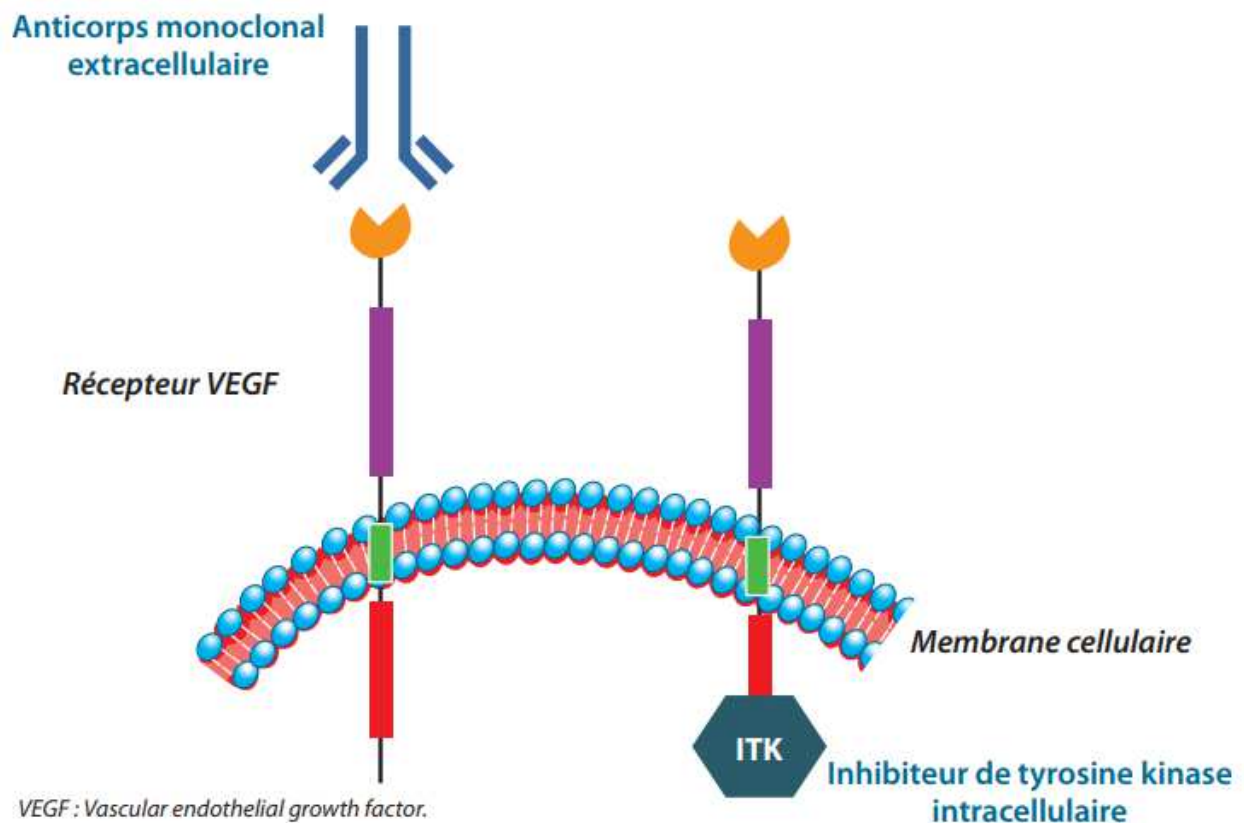


Figure 13 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux et des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK)[32]

4.1.1.2.1. Bloqueurs d'EGFR

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor receptor [EGFR] ou Human EGF receptor related [HER] selon la nomenclature) est impliqué dans le développement de nombreuses tumeurs épithéliales (sein, côlon, poumon, pancréas...). Les anticorps monoclonaux actuellement commercialisés sont le **cétuximab** et le **panitumumab**.

Cette dernière molécule présente une structure d'origine humaine qui limite les réactions d'hypersensibilité qui peuvent être décrites avec le **cétuximab** qui est un anticorps chimérique.

Ces anticorps monoclonaux sont des inhibiteurs compétitifs du récepteur à l'EGF qui agissent en se fixant sur le site de liaison de l'EGF. Par ailleurs, le **trastuzumab** et le **pertuzumab** sont des anticorps monoclonaux antiHER qui inhibent, respectivement, la transduction du signal et la prolifération cellulaire (**tableau 2**)[32].

Tableau 2 : Principaux anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique anti-tumorale[32]

Indication	Molécule/ Cible Pharmacologique	Spécialité
Cancer colorectal	Panitumumab EGFR	Vectibix®
Cancer de la tête et du cou	Cétuximab EGFR	Erbitux®
Cancer du sein (Positif au récepteur HER)	Pertuzumab EGFR	Perjeta®
Cancer de l'estomac (Positif au récepteur HER)	Trastuzumab EGFR	Herceptin®
Cancer du rein avancé ou métastatique cancer bronchique non à petites cellules métastatiques, cancer du rein métastatique (1 ^{ère} ligne), cancer de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif (stade avancé ou 1 ^{re} récurrence)	Bévacizumab VEGFR	Avastin®

Cancer colorectal métastatique	Aflibercept VEGFR	Zaltrap®
Lymphome non hodgkinien en rechute ou réfractaire, lymphome non hodgkinien positif au CD20, folliculaire	Rituximab CD20	Mabthera®
Leucémie lymphoïde chronique	Ofatumumab CD20	Arzerra®

4.1.1.2.2. Bloqueurs des récepteurs au VEGF



Figure 14 : Représentation de l'angiogenèse et de l'action des médicaments anti-angiogéniques. La tumeur nouvellement formée est encore isolée et produit notamment du VEGF qui stimule la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Les médicaments anti-angiogéniques bloquent l'action du VEGF. Les cellules tumorales meurent alors par nécrose[32].

Les récepteurs au Vascular endothelial growth factor (VEGF) sont des récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans la régulation de l'angiogenèse en favorisant la croissance et la maturation vasculaires. Parmi les molécules actuellement commercialisées (**tableau 2**) se distinguent le **bévacizumab** et l'**aflibercept** qui sont respectivement des anticorps monoclonaux et une protéine de fusion. Bien que leur structure soit différente, leur mécanisme d'action est identique, c'est-à-dire que ces médicaments se comportent comme des molécules neutralisant l'activité du VEGF, principal facteur de croissance vasculaire. La neutralisation de l'activité du VEGF permet de faire régresser la croissance des vaisseaux tumoraux, de normaliser les vaisseaux existants, d'inhiber la néoformation de vaisseaux et donc d'inhiber la croissance tumorale[32].

4.1.1.2.3. Anti-CD

Les Cluster of differentiation (CD) sont des antigènes de surface exprimés par de nombreuses cellules de l'organisme.

Ainsi, le CD20 est exprimé par les lymphocytes B et les cellules B lymphomateuses. Il s'agit, chez un patient sain, d'un antigène passif qui ne présente pas de propriétés oncogéniques, c'est-à-dire qu'il est exprimé à la surface des cellules saines ou tumorales.

Le premier anticorps anti-CD20 commercialisé a été le **rituximab**, capable d'induire la cytotoxicité par apoptose des cellules de lymphomes. L'**ofatumumab** est un second anticorps anti-CD20 qui est efficace en cas de résistance au **rituximab**(**tableau 1**).

4.1.1.2.4. Molécules d'immunothérapie

De nombreuses molécules sont actuellement en développement clinique et seul l'**ipilimumab** (**Yervoy®**, 3 mg/kg toutes les trois semaines pendant quatre cycles) est disponible dans le traitement du mélanome métastatique.

Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui reconnaît et inhibe un antigène spécifique des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) qui, physiologiquement, est un régulateur négatif des lymphocytes T cytotoxiques. Ainsi, en bloquant le signal inhibiteur, les

lymphocytes T sont activés, ce qui favorise leur prolifération, leur infiltration dans les tumeurs permettant la mort des cellules tumorales[32].

4.1.1.4. Toxicité

En dépit de leur action plus ciblée que celle des chimiothérapies cytotoxiques, les thérapies par anticorps monoclonaux ne sont pas dénuées d'effets indésirables.

Alors que ces molécules sont peu ou pas myélotoxiques, elles sont à l'origine d'une toxicité digestive et cutanée significative, mais également de réactions à la perfusion.

4.1.1.4.1. Principaux effets indésirables

- **Des réactions précoces à la perfusion des anticorps monoclonaux** ont été décrites, en particulier avec le **cétuximab**, très rarement avec le **panitumumab**. Les principaux symptômes rapportés sont une fièvre, des frissons, des céphalées, des vertiges et/ou une dyspnée. Ces symptômes se déclarent le plus souvent pendant ou au décours de la première injection. Ces réactions peuvent être sévères et entraîner un choc anaphylactique qu'il convient de prévenir par une prémédication d'antihistaminiques H1 par exemple.
- **Les principales manifestations cutanées sont retrouvées avec les inhibiteurs de l'EGFR** et la principale complication de ce type est une réaction papulo-pustuleuse de type folliculite ou acnéiforme qui se développe sur les zones séborrhéiques de la face, du cuir chevelu, du torse et du dos. Elle est retrouvée chez 60 à 80 % des patients, en particulier chez ceux traités par **cétuximab**. Très souvent associée à un prurit conséquent, cette réaction est dose-dépendante. Elle est constatée assez rapidement, soit 8 à 21 jours suivant l'instauration du traitement, et est réversible à son arrêt.

La physiopathologie de cette folliculite n'est pas complètement connue mais il semble que l'inhibition de l'activité de l'EGFR au niveau des kératinocytes entraîne une réaction inflammatoire conséquente par fuite de sébum dans le derme, suivie d'une production accrue de cytokines pro-inflammatoires.

- **D'autres atteintes cutanées sont décrites** : des lésions croûteuses qui se développent au niveau de la face et du nez, ainsi qu'une xérose cutanée fréquente avec les inhibiteurs d'EGFR (dans un tiers des cas au moins) qui accompagne, ou non, les complications décrites ci-dessus.
- **Dans certains cancers otorhinolaryngologiques (ORL)**, le traitement par **cétuximab** peut être combiné à une radiothérapie susceptible de potentialiser la toxicité cutanée. Ainsi, des cas de radiodermite ont été rapportés en nombre plus important chez des patients sous **cétuximab** par rapport à ceux placés sous radiothérapie seule.
- **Des troubles digestifs (nausées, diarrhées)** sont parfois décrits avec les anticorps monoclonaux. Rarement sévères, ces complications peuvent cependant entraîner l'arrêt du traitement.

Les mécanismes physiopathologiques sont variables avec des diarrhées sécrétoires avec fuite d'électrolytes et d'eau avec les inhibiteurs de l'EGFR, d'origine ischémique avec les inhibiteurs du VEGF et d'origine immunitaire avec l'**ipilimumab**.

Des nausées peuvent être décrites mais sont relativement rares, tout comme les vomissements, quasiment absents au cours de ces traitements.

- **Les effets indésirables cardiovasculaires** surviennent essentiellement sous bévacizumab. Une hypertension artérielle (HTA), d'installation progressive mais pouvant se généraliser pour devenir constante à long terme, a été décrite avec cette molécule. Les différents mécanismes à l'origine de cette HTA sont une diminution de la production de facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO), une raréfaction des microvaisseaux et une augmentation des résistances périphériques. Cette augmentation de pression artérielle est réversible à l'arrêt du traitement et son incidence est dose-dépendante.

- Par ailleurs, des **accidents thromboemboliques artériels ou veineux (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral ou accident ischémique transitoire)** sont beaucoup plus fréquents chez les patients sous **bévacizumab** présentant des antécédents thromboemboliques ou chez les plus de 65 ans et/ou hypertendus.

La survenue d'un accident artériel entraîne l'arrêt définitif du traitement.

Même si le risque de thrombose veineuse ne semble pas être potentialisé par le **bévacizumab**, en cas de survenue d'un tel événement, le traitement doit être suspendu pendant deux à trois semaines, puis réintroduit après anticoagulation efficace et stable.

Par ailleurs, des risques d'insuffisance cardiaque ont été rapportés sous traitements par les anti-HER (**trastuzumab** ou **pertuzumab**).

4.1.1.4.2. Autres effets indésirables

Différents effets secondaires ont été rapportés avec les molécules anti-CD ou les molécules d'immunothérapie.

Ainsi, un syndrome de relargage des cytokines a été décrit avec les anti-CD20. Sévère dans 5 à 10 % des cas, ce syndrome associe fièvre, frissons, asthénie, céphalées, œdèmes, hypotension et prurit.

Avec ces mêmes molécules, une toxicité hématologique (lymphopénie, neutropénie, thrombopénie) a été décrite, justifiant d'un suivi biologique afin d'éviter les risques infectieux et hémorragiques.

Enfin, de rares cas d'hypogammaglobulinémie ont été rapportés chez des patients traités par **rituximab**.

4.1.1.4.3. Grossesse et allaitement

Il existe peu de données relatives à l'utilisation des anticorps monoclonaux chez les femmes enceintes ou allaitantes.

Toutefois, les études réalisées chez l'animal ont mis en évidence une toxicité conduisant à des malformations fœtales justifiant de contre-indiquer les anticorps

monoclonaux au cours de la grossesse et chez les femmes en âge de procréer. Ainsi, chez ces dernières, une méthode de contraception efficace devra être proposée pendant le traitement et les mois qui suivent son arrêt. Cependant, en cas de nécessité absolue, un traitement pourra être initié après évaluation très fine des bénéfices attendus pour la mère et des risques éventuels pour le fœtus.

Si le traitement est prescrit à un homme, une congélation du sperme pourra être proposée avant son instauration.

Le cas échéant, une contraception efficace devra être envisagée.

4.1.1.4. Interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses impliquant les anticorps monoclonaux sont rares et peu nombreuses.

Cependant, il convient de ne pas associer de molécules anti-angiogéniques entre elles. En effet, des cas d'hypertension (avec poussées hypertensives), une atteinte rénale associée à une hyper-créatininémie ainsi que des symptômes neurologiques ont été observés chez certains patients[32].

4.1.1.5. Mécanisme de résistance

Ce domaine est encore mal connu. Cependant, quelques mécanismes de résistance ont été décrits. Sous la pression de sélection exercée par l'anticorps monoclonal, il existe quelques cas de moindre expression de la molécule CD20 (lymphomes B) dans la population tumorale résiduelle ou au moment d'une récurrence. Chez des patients traités par l'**alemtuzumab** (ou son précurseur murin) des populations lymphocytaires CD52 négatives sont apparues.

L'activation du complément peut être bloquée, à différentes étapes, par l'expression de molécules anti-complémentaires (CD55, CD59), elles aussi fixées dans la membrane cellulaire.

Ce mécanisme a été évoqué pour expliquer la moindre sensibilité des leucémies lymphatiques chroniques à l'effet du **rituximab** (anti-CD20). De plus, les leucémies lymphatiques chroniques à lymphocytes B expriment le CD20 en faible quantité.

Le phénotype de résistance multidrogue peut aussi contribuer à l'expulsion hors de la cellule d'un agent de chimiothérapie, introduit dans la cellule après ciblage par un vecteur monoclonal [35].

4.1.2. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase

4.1.2.1. Définition

Les récepteurs tyrosine kinases ont des fonctions cruciales dans les voies de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et le métabolisme, la migration, l'angiogenèse et la survie. Une activité RTK aberrante a été associée au développement de tumeurs et à une croissance cellulaire anormale. En raison de ce potentiel oncogène élevé, les RTK sont devenues une cible privilégiée dans le traitement du cancer. Dans le génome humain, 58 RTK ont été identifiés, répartis en 20 sous-familles telles que définies par le récepteur et/ou le ligand, comprenant des récepteurs pour l'insuline et des facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), des dérivés de plaquettes. Facteur de croissance (PDGF), facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et facteur de croissance nerveuse.

Les RTK catalysent le transfert du phosphate d'adénosine triphosphate (ATP) aux groupes hydroxyle des tyrosines sur les protéines cibles. Tous les RTK contiennent un domaine de liaison au ligand extracellulaire hautement glycosylé (ECD) connecté au domaine catalytique cytoplasmique à l'extrémité carboxy-terminale avec l'activité kinase par un seul domaine transmembranaire. La liaison du ligand au domaine extracellulaire induit une homo- ou une hétérodimérisation des récepteurs et des activations subséquentes. Les récepteurs dimérisés induisent la phosphorylation des résidus de tyrosine sur les récepteurs eux-mêmes et sur les protéines en aval, initiant ainsi des cascades de signalisation. Des voies de signalisation cytoplasmiques multiples [protéine kinase activée par le mitogène (MAPK), la phospholipase C, la PI3-kinase, le transducteur de signal et l'activateur de la transcription-3 (STAT3), la

SRC / FAK, la protéine kinase C et la JAK / STAT] peuvent être activées entraînant une modification de la synthèse de l'ADN et de la division cellulaire ainsi que des effets sur divers processus biologiques, notamment la croissance, la migration, la différenciation et la mort cellulaires.

En raison de leur rôle clé dans les voies de signalisation qui affectent tous les aspects de la croissance, de la différenciation et du métabolisme cellulaires, les PTK sont devenues des cibles de choix pour la thérapie dirigée contre le cancer. Un grand intérêt a été consacré au développement de petites molécules, les ITK, une nouvelle classe de médicaments dotés d'un mécanisme d'action unique. Contrairement aux anticorps monoclonaux (AcM), les ITK peuvent migrer à travers les membranes plasmiques et interagir avec le domaine cytoplasmique des récepteurs à la surface des cellules et peuvent être administrés par voie orale [36].

Mis sur le marché il y a une quinzaine d'années, les inhibiteurs de tyrosine kinase contribuent à améliorer significativement la prise en charge de nombreux cancers, au premier rang desquels la leucémie myéloïde chronique dont ces traitements ont révolutionné le pronostic. Ces molécules sont indiquées dans des formes compliquées de cancers métastasés et, en dépit d'un mécanisme d'action intracellulaire spécifique, elles présentent de nombreux effets indésirables dits de "classe" pour lesquels un conseil officinal ou un diagnostic médical est nécessaire.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase peuvent être divisés en deux groupes : les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs couplés à une tyrosine kinase. Ces derniers sont dépourvus d'activité enzymatique. Ainsi, la fixation de leur ligand favorise la dimérisation (ou trimérisation) du récepteur, permettant le recrutement et l'activation de tyrosine kinase cytosolique.

Les récepteurs tyrosine kinase sont composées de trois domaines : une région extracellulaire correspondant au domaine de liaison du ligand, une courte séquence transmembranaire et une région intracellulaire qui possède le domaine à activité tyrosine kinase.

Les tyrosine kinases sont des protéines qui amplifient et contrôlent les nombreux signaux intracellulaires en favorisant des phosphorylations sélectives des résidus tyrosine sur d'autres protéines, voire sur elles-mêmes. Suite à leur activation, les kinases lient l'adénosine triphosphate (ATP) et le groupement phosphate terminal de l'ATP est transféré sur le substrat pour permettre son activation.

Les ITK sont des molécules de petite taille qui ont la capacité de diffuser à travers la membrane plasmique des cellules et d'interagir au niveau du site de fixation de l'ATP. Ces molécules assurent un blocage compétitif du site kinase ATP-dépendant qui empêche la phosphorylation de protéines cibles en aval du récepteur [37].

4.1.2.2. Pharmacologies des ITKs

4.1.2.2.1. Les inhibiteurs de BCR-Abl

Les ITK, dont le chef de file est l'**imatinib**, miment les effets de l'ATP en se fixant à la tyrosine kinase soluble Breakpoint cluster region-Abelson (BCR-Abl). Cette protéine est formée suite à une translocation chromosomique (chromosome Philadelphie) qui a pour conséquence la surexpression de la protéine kinase BCR-Abl impliquée dans la prolifération des cellules hématopoïétiques qui l'exprime. Ces molécules sont donc des inhibiteurs compétitifs puissants de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL qui s'oppose à la prolifération des cellules porteuses de cette protéine. Par ailleurs, les inhibiteurs de BCR-Abl sont également capables d'inhiber l'activité d'autres kinases (récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes ou Platelet-derived growth factor [PDGF] par exemple), ce qui explique les récentes extensions d'indications de certaines de ces molécules.

La principale indication de l'**imatinib** est la leucémie myéloïde chronique (LMC) à chromosome Philadelphie positif (Ph+) nouvellement diagnostiquée lorsque la greffe de moelle osseuse n'est pas possible ou en phase chronique, après échec de l'interféron alpha ou en cas de crise blastique.

Parmi les autres inhibiteurs de BCR-Abl, le **nilotinib**, le **bosutinib** et le **dasatinib** présentent une affinité pour le site de liaison de l'ATP supérieure à celle de l'**imatinib**,

ce qui justifie son utilisation dans le traitement des formes résistantes à l'**imatinib**[38, 39].

Dans certaines LMC Ph+ porteuses d'autres mutations, le **ponatinib** sera préféré à l'**imatinib** en première intention(**tableau 3**).

Tableau 3 : Principales molécules inhibitrices de Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR-Abl)[37]

Indication	Molécule	Spécialité
LMC Ph+	Imatinib	Glivec®
Syndromes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs et hyperéosinophiliques associés à des réarrangements du gène du PDGFR chez l'adulte		
LMC Ph+ résistante à l'imatinib	Nilotinib	Tasigna®
	Bosutinib	
	Dasatinib	Bosulif®
	Ponatinib	Sprycel® clusig®

4.1.2.2.2. Les inhibiteurs d'EGFR

Les inhibiteurs d'EpidermalGrowth Factor Receptor (EGFR) sont des inhibiteurs sélectifs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs à l'EGF entraînant l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire tumorale (**tableau 4**). L'**erlotinib** et le **géfitinib**, inhibiteurs de l'EGFR de première génération, sont utilisés à ces fins dans différentes tumeurs.

Cependant, de nombreuses mutations activatrices du domaine tyrosine kinase de l'EGFR ont été rapportées dans différentes tumeurs, en particulier les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC) [40], situation dans laquelle les inhibiteurs de première génération sont moins efficaces. La mise sur le marché de nouvelles molécules de seconde génération (**lapatinib**, **afatinib**) a permis d'améliorer significativement la survie des patients porteurs de ces tumeurs [41].

À l'exception du **géfitinib**, toutes ces molécules inhibitrices de l'EGFR doivent être prises à distance des repas (au moins une heure avant ou deux à trois heures après).

En effet, la prise d'aliments peut augmenter l'exposition après une prise orale.

Tableau 4 : Principales molécules inhibitrices de l'EpidermalGrowth Factor Receptor (EGFR)

Indication	Molécule	Spécialité
Cancer du pancréas	Erlotinib	Tarceva®
CBNPC sans mutation activatrice d'EGFR		
CBNPC avec mutation activatrice d'EGFR	Géfitinib	Tasigna®
	Afatinib	Giotrif®
Cancer du sein HER+	Lapatinib	Tyverb®

4.1.2.2.3. Les ITK des VEGFR

En agissant par compétition avec l'ATP au niveau de son site de fixation au Vascular endothelial growth factor (VEGF), les ITK des récepteurs au VEGF (VEGFR), anti-angiogéniques, empêchent la phosphorylation des tyrosines kinases bloquant ainsi la transduction du signal.

Ces inhibiteurs agissent préférentiellement sur le microenvironnement tumoral et notamment sur les cellules endothéliales constituant les néovaisseaux, mais ils exercent des effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire tumorale par des mécanismes indirects.

Ces molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase présentent l'avantage d'être multicibles, à savoir qu'elles sont capables d'inhiber différentes kinases, autres que celles portées par les VEGFR. Ceci explique les nombreuses indications des molécules de ce groupe mais également l'apparition possible d'effets indésirables importants (tableau 5).

Tableau 5 : Principales molécules inhibitrices des récepteurs aux VascularEndothelialGrowth Factor (VEGFR)

Indication	Molécule	Spécialité
Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) non résécables et/ou métastatiques, chez l'adulte après échec de l'imatinib Tumeur neuro-endocrine du pancréas	Sunitinib	Sutent®
Cancer du rein avancé ou métastatique	Axitinib Pazopanib	Inlyta® Votrient®
Carcinome hépatocellulaire	Sorafénib	Nexavar®
Cancer colorectal métastatique	Régorafénib	Stivarga®
Cancer médullaire de la thyroïde non résécable ou métastatique	Vandétanib	Caprelsa®

4.1.2.2.4. Les inhibiteurs de B-RAF

B Rearrangement Activated Fibrosarcoma (B-RAF) est une kinase impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire. De nombreuses mutations de cette protéine ont été constatées dans des formes évoluées de mélanomes conduisant à une prolifération incontrôlée des cellules tumorales cutanées. Différents travaux ont rapporté que les inhibiteurs de B-RAF permettent d'obtenir, dans les formes métastasées de mélanomes, des taux de réponse significatifs et une survie augmentée par rapport aux molécules de référence [42-44]. Cependant, les effets indésirables cutanés sont importants et des cas d'échappement tumoral ont été rapportés avec ces molécules (tableau 6).

Tableau 6 : Principales molécules inhibitrices de B Rearrangement Activated Fibrosarcoma (B-RAF)

Indication	Molécule	Spécialité
Mélanome non résécable ou	Vémurafenib	Zelboraf®
métastatique porteur de mutation B-RAF	Dabrafenib	Tafinlar®

4.1.2.2.5. Les inhibiteurs de JAK

Les récepteurs couplés à une tyrosine kinase sont également ciblés par les ITK. Il s'agit des récepteurs aux cytokines qui ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque mais qui sont associés à des tyrosines cytoplasmiques, les Janus Kinases (JAK). L'activation de ces kinases favorise l'activité de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules sanguines. Actuellement, une seule molécule est commercialisée dans la prise en charge de la splénomégalie ou des symptômes liés à la maladie chez la personne atteinte de myélofibrose primitive ou secondaire à la maladie de Vasquez ou secondaire à la thrombocytopénie essentielle (30 à 40 mg/jour selon numération plaquettaire avec arrêt si plaquettes inférieures à 50 G/L). Selon les données de la littérature, 90 % des polyglobulies de Vasquez et 50 % des splénomégalies myéloïdes et des thrombocytopénies expriment une forme mutée

de la protéine kinase JAK, entraînant une dérégulation de ses fonctions de signalisation avec une auto-inhibition de l'activité tyrosine kinase.

4.1.2.2.6. Les inhibiteurs d'ALK

La protéine kinase Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) appartient à la superfamille des récepteurs à l'insuline. Douée d'une activité tyrosine kinase, cette protéine est retrouvée mutée, suite à une translocation, dans 5 % des adénocarcinomes bronchiques [45].

Actuellement, une seule molécule (dite inhibiteur d'ALK de première génération) est commercialisée et indiquée dans les cancers bronchiques non à petites cellules avancés ou métastatiques et positifs à ALK. Il s'agit du **crizotinib** (à raison de 500 mg en deux prises pour les gélules et 280 mg/m²/jour pour la solution buvable), qui présente l'avantage d'être inhibiteur de trois récepteurs à activité tyrosine kinase surexprimés dans les cancers bronchiques, dont le récepteur ALK.

4.1.2.2.7. Les inhibiteurs de la BTK

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie relativement fréquente qui est incurable, hormis si une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est réalisée.

Cette pathologie est associée à une suractivation des voies de signalisation dépendantes du récepteur au lymphocyte B et notamment de la voie de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK).

Tandis que les fonctions physiologiques de cette tyrosine kinase sont mal connues (chimiotactisme et adhésion des cellules B), une molécule actuellement commercialisée, l'**ibrutinib**, inhibe de manière non sélective la BTK dans la prise en charge des lymphomes à cellules du manteau (LCM) en rechute ou réfractaires, des leucémies lymphoïdes chroniques après échec d'au moins un traitement antérieur ou des patients souffrant d'une macroglobulinémie de Waldenström ayant reçu au moins une thérapie antérieure. Dans ce cas, la posologie est de 420 à 560 mg/jour en une prise.

4.1.2.3. Toxicité des inhibiteurs de tyrosine kinase

Comme les autres anticancéreux, les ITK peuvent être à l'origine d'effets indésirables, plus ou moins nombreux et graves, pouvant être à l'origine de l'arrêt temporaire ou définitif du traitement. Ils peuvent détériorer la qualité de vie des patients mais également compromettre le bon déroulement du traitement. Il n'existe pas de données chiffrées décrivant les effets indésirables de l'ensemble des ITK. Seules des études par catégorie de molécules ont été réalisées et ont permis d'identifier les effets secondaires majeurs.

4.1.2.3.1. Les affections cutanéomuqueuses

- **Le syndrome main-pied** survient très fréquemment au cours du premier mois de traitement avec la plupart des ITK, en particulier avec le **sunitib**, le **lapatinib** et le **sorafénib**. Cet effet indésirable est temporaire et dose-dépendant puisqu'il régresse spontanément lors d'une diminution de dose ou à l'arrêt définitif du traitement. Il évolue en trois grades :
- le grade 1 (léger), avec modifications cutanées minimales, sans douleur et éventuellement un léger érythème ;
 - le grade 2 (moyen), avec modifications cutanées à type de desquamations, phlyctène, œdèmes associées à une douleur sans retentissement sur les activités quotidiennes ;
 - le grade 3 (sévère), caractérisé par des modifications cutanées importantes et une douleur impactant considérablement les activités quotidiennes.

Les zones de pression des pieds (têtes de métatarses) et de microtraumatismes (cors ou durillons préexistants) sont préférentiellement affectées.

Les mains sont également touchées au niveau des articulations inter-phalangiennes ou métacarpo-phalangiennes et des zones de préhension. Le patient ressent, à terme, une inflammation importante associée à une douleur et une sensation de brûlure et de paresthésie.

- **Les stomatites et mucites** se caractérisent par une inflammation et une ulcération de la muqueuse buccale. Le plus souvent induits par le **sunitinib**, le **lapatinib** et le **géfitinib**, ces effets indésirables évoluent en cinq grades, proposés par le National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) [37] allant du grade 1, avec légère douleur ne gênant pas l'alimentation par voie orale au grade 5 pouvant induire la mort.
- La phase d'initiation des stomatites s'explique par la formation de lésions directes, induites par les chimiothérapies, entraînant une altération des cellules de l'épithélium. Cette altération entraîne une réponse inflammatoire mobilisant différentes voies de signalisation qui contribue à la mort cellulaire par apoptose. Une fois formées, les lésions d'ulcération douloureuses deviennent sujettes à la colonisation bactérienne, complication fréquente de ces effets indésirables.
- **Les toxicités à type de prurit, éruptions cutanées, rash, érythème ou encore dermite acnéiforme** sont observées avec quasiment tous les ITK et en particulier les inhibiteurs de l'EGFR ou de BCR-Abl. Une graduation des rashes et de la sécheresse cutanée a été proposée.

Ainsi, s'agissant du rash cutané :

- le grade 1 est caractérisé par des éruptions maculo-papuleuses sans symptômes associés ;
- le grade 2 présente les mêmes symptômes couplés à un prurit ou d'autres symptômes tels que des desquamations localisées ou des lésions recouvrant au moins 50 % de la surface corporelle ;
- le grade 3 est associé à des lésions sévères, une érythrodermie généralisée ou des éruptions papuleuses ou vésiculeuses, ainsi que des desquamations recouvrant plus de 50 % de la surface corporelle ;
- le grade 4 est défini par une exfoliation généralisée ainsi qu'une dermatite ulcérate ou bulleuse ;

- le grade 5 est caractérisé par le décès du patient [37].

La graduation de la sécheresse cutanée est basée sur trois niveaux :

- le grade 1, caractérisé par une sécheresse cutanée recouvrant au moins 10 % de la surface corporelle en absence d'érythème ou de prurit ;
 - le grade 2, associé à une atteinte de 10 à 30 % de la surface corporelle avec érythème ou prurit entraînant des répercussions sur les activités de la vie quoti-dienne ;
 - le grade 3, avec atteinte de plus de 30 % de la surface corporelle et prurit entraînant des répercussions sur les activités de la vie quotidienne.
- **Des péri-onychies et des lésions de l'ongle** caractérisées par une excroissance tissulaire vascularisée et friable sur ses replis cutanés latéraux peuvent être rencontrées chez les patients traités par les inhibiteurs de l'EGFR. Ces réactions s'expliqueraient par une inhibition du métabolisme de l'acide rétinoïque dans lequel le récepteur à l'EGF serait impliqué. Elles peuvent se compliquer, les péri-onychies étant susceptibles de se surinfecter.
- **Une fragilité capillaire et/ou une alopécie** peuvent également être relevées. La voie de signalisation dépendante de l'EGFR est impliquée dans le cycle de formation du cheveu. En bloquant cette voie, les ITK conduisent à l'arrêt de propagation du cycle du cheveu et à la désorganisation de la formation du follicule pileux. Ces effets délétères sont temporaires et réversibles à l'arrêt ou en cas d'ajustement du traitement.
- **Une diminution des sécrétions lacrymales à l'origine d'une sécheresse oculaire** est associée à l'utilisation des ITK. Elle provoque une gêne (sensation de grain de sable sous la paupière), des yeux rouges, des picotements, voire des brûlures et, parfois, une photophobie. Cet effet indésirable peut, dans certaines situations, se compliquer en conjonctivite bactérienne ou virale qu'il convient de surveiller pour éviter toute sévérité.

- **La sécheresse buccale et la dysgueusie** sont fréquemment décrites avec l'ensemble des molécules et en particulier avec le **sunitinib** (46 % des patients). Les cellules sensorielles présentes au niveau de la langue subissent une altération qui explique que les patients atteints de dysgueusie rapportent souvent une perte de la perception amère et acide [46, 47].

4.1.2.3.2. Les affections gastro intestinales

- Les diarrhées sont très fréquentes lors d'un traitement par ITK (30 à 50 % des patients sous **sorafénib**, **sunitinib** ou **imatinib**) [48]. Cinq grades sont répertoriés (chez les patients non stomisés) :
- le grade 1, caractérisé par une augmentation d'au moins quatre selles par jour ;
 - le grade 2, décrit comme une augmentation de quatre à six selles par jour ;
 - le grade 3, avec une augmentation d'au moins sept selles par jour et/ou une incontinence nécessitant une hospitalisation ;
 - le grade 4, pour lequel les conséquences peuvent être mortelles et une intervention médicale d'urgence est indiquée ;
 - le grade 5, associé au décès du patient [37].
- **Les nausées et les vomissements** font partie, avec l'alopecie, des effets indésirables les plus redoutés sous chimiothérapie. Cinq grades sont distingués selon les symptômes rencontrés [37]. Une classification des anticancéreux permet d'identifier ces derniers selon qu'ils sont très faiblement (risque < 10 %), faiblement (risque compris entre 10 et 30 %), moyennement (risque compris entre 31 et 90 %) et hautement (risque > 90 %) émétisants. Ainsi, la plupart des ITK sont très faiblement émétisants, exceptés le nilotinib et l'imatinib qui le sont, respectivement, faiblement et moyennement.

4.1.2.3.3. Les troubles généraux

- **La fatigue** est inhérente à la maladie cancéreuse, mais peut être rapportée et accrue en sévérité en fonction des doses utilisées. Ainsi, la fatigue engendrée par l'utilisation de **sorafénib** ou de **sunitinib** est plus fortement ressentie trois à quatre semaines après l'instauration du traitement [48]. Toutefois, il est important d'identifier des causes de fatigue secondaires qui doivent être traitées avant toute prise en charge. Une hypothyroïdie, une anémie, une dépression, une insomnie, la douleur, la polymédication et/ou la malnutrition peuvent en être la cause.
- **Les douleurs musculosquelettiques** sont fréquemment décrites lors de l'utilisation de **nilotinib**, **dasatinib** et **imatinib** (40, 10 et 10 à 15 % respectivement) [49, 50]. Les crampes musculaires sont d'une intensité légère à modérée et généralement localisées au niveau des mains, des pieds, des cuisses et des mollets. Elles peuvent survenir la nuit, en l'absence d'effort physique particulier mais également lors d'activité musculaire.
- **Les œdèmes péri-orbitaires modérés** sont très fréquents sous **imatinib**. Cette localisation s'explique par une distension plus importante du tégument à ce niveau. Ces manifestations peuvent se compliquer en cas de rétention hydrique très importante caractérisée par un œdème des membres, un épanchement pleural, une ascite et un œdème pulmonaire accompagné d'une prise de poids conséquente. Ce dernier paramètre est un facteur d'alerte important.

4.1.2.3.4. La toxicité hématologique

Les inhibiteurs de BCR-Abl ainsi que le **sunitinib** ou le **sorafénib** peuvent être à l'origine d'une toxicité hématologique à type de lymphopénie, neutropénie ou thrombopénie qu'il convient de contrôler (numération-formule sanguine [NFS]) afin de s'assurer de l'absence de risque infectieux et hémorragique.

4.1.2.3.5. La toxicité cardiovasculaire

Certaines molécules (**dasatinib**, **nilotinib**, **sunitinib**, **vandétanib**, **vémurafénib**, **crizotinib**) entraînent parfois un allongement de l'espace QT dont les conséquences peuvent mettre en jeu le pronostic vital. Par ailleurs, un risque d'insuffisance cardiaque nécessitant une surveillance de la fraction d'éjection ventriculaire peut être retrouvé avec le **dasatinib**, le **sunitinib**, le **sorafénib** et le **lapatinib**.

4.1.2.3.6. Grossesse et allaitement

Comme pour les autres thérapies ciblées, peu de données relatives à l'utilisation des ITK chez les femmes enceintes ou allaitantes sont disponibles. Toutefois, les études réalisées chez l'animal mettent en évidence une toxicité conduisant à des malformations fœtales justifiant de contre-indiquer ces molécules au cours de la grossesse et chez les femmes en âge de procréer.

Si le traitement est prescrit à un homme, une congélation du sperme pourra être proposée avant son instauration.

Le cas échéant, une contraception efficace sera envisagée.

4.1.2.3.7. Principales interactions médicamenteuses

La solubilité de plusieurs ITK est dépendante du pH. Ainsi, l'administration simultanée de ces molécules avec d'autres traitements augmentant le pH gastrique (anti-acides, inhibiteurs de la pompe à protons [IPP]) doit être évitée.

Les ITK étant principalement métabolisés au niveau hépatique via le CYP3A4, les associations avec les inducteurs et les inhibiteurs sont donc déconseillées. S'agissant de l'imatinib, qui inhibe l'O-glycuroconjugaison du paracétamol, il convient d'éviter cette association médicamenteuse.

En raison d'un risque d'augmentation de l'espace QT observé avec certains ITK, il est contre-indiqué d'associer ces molécules avec d'autres médicaments entraînant les mêmes effets, du fait d'un risque de torsade de pointe. La prudence est de mise lorsque les inhibiteurs de BCR-Abl sont associés aux anticoagulants ou à des antiagrégants plaquettaires [50].

4.1.2.4. Principaux mécanismes de résistances aux ITKs

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sont étroitement liés à leur mode de fonctionnement. Pour des raisons didactiques, il convient de distinguer ceux dépendants :

- ▲ Du médicament, c'est-à-dire relatifs au domaine de la pharmacocinétique ;
- ▲ De la cible oncogénique BCR-Abl ;
- ▲ De la cellule leucémique, en rapport ou liés aux différentes voies de transduction du signal (**figure 12**). Il est utile aussi de bien distinguer ceux identifiés *in vitro* à partir de lignées cellulaires, de ceux observés chez les patients[51].

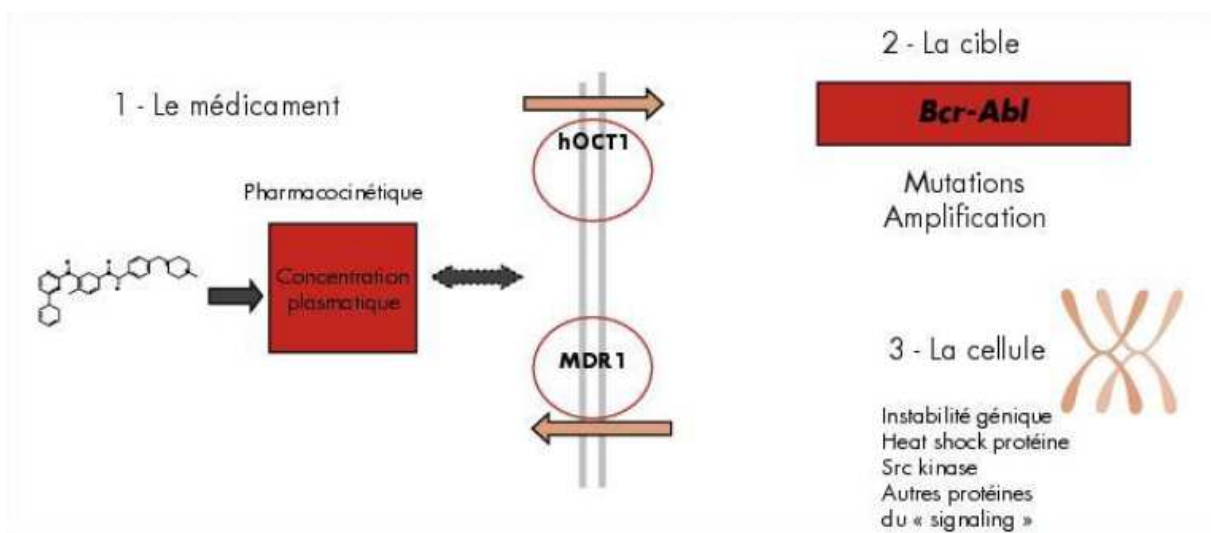


Figure 15 : Principaux mécanismes de résistance à l'*imatinib*: trois partenaires importants[51]

4.2. Classification selon le mode d'action

4.2.1. Thérapie ciblée visant la cellule tumorale au niveau membranaire

4.1.2.1. La famille HER

La famille HER (récepteur du facteur de croissance épidermique humain, également connu sous le nom de famille ErbB) comprend quatre récepteurs transmembranaires tyrosine kinases, HER1 (EGFR), HER2, HER3 et HER4. Ces récepteurs signalent par l'intermédiaire de complexes homodimériques et hétérodimériques et contrôlent les voies de signalisation intracellulaire qui favorisent la croissance, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules. L'expression et l'activité dérégulées des récepteurs de la famille HER sont fréquentes dans le cancer du sein et sont associées à un mauvais pronostic. Deux stratégies principales pour cibler les récepteurs de la famille HER ont été développées : les anticorps monoclonaux (**Cetuximab** et **Trastuzumab**) qui ciblent le domaine extracellulaire et les inhibiteurs de petites molécules (**Géfitinib** et **Erlotinib**) qui ciblent le domaine de la tyrosine kinase. Cependant, divers mécanismes ont été rapportés pour causer une résistance au traitement ciblé contre les récepteurs de la famille HER dans les cancers du sein, y compris la réduction de l'expression HER et de l'affinité des anticorps, une signalisation pro-survie accrue par le biais d'autres récepteurs tyrosine kinases ou une signalisation intracellulaire altérée conduisant à une surprolifération cellulaire. La Piperlongumine (PL), un alcaloïde naturel du poivre long (*Piper longum*), est capable d'inhiber la croissance du sarcome, de la vessie, du sein, du mélanome et des tumeurs pulmonaires in vitro et in vivo. La PL se lie directement à l'enzyme antioxydante glutathion S-transférase pi 1 et l'inhibe, ce qui entraîne un taux élevé d'oxygène réactif intracellulaire (ROS) et la mort apoptotique subséquente dans les cellules cancéreuses, sans toxicité apparente dans les cellules normales. Les cellules cancéreuses ont des niveaux accrus de ROS et d'enzymes antioxydantes par rapport aux cellules normales

en raison de leur métabolisme élevé. Ainsi, les cellules cancéreuses sont plus vulnérables que les cellules normales aux agents qui induisent un stress oxydatif supplémentaire ou altèrent la réponse antioxydante. Le PL régule à la baisse l'activation du NF- κ B et induit une déplétion rapide du récepteur des androgènes dans les cellules cancéreuses de la prostate. De plus, PL favorise l'autophagie dans plusieurs types de cellules cancéreuses, y compris le cancer du sein, le carcinome rénal et l'ostéosarcome humain [52].

4.1.2.2. Kit et PDGF-R (Exemple Imatinib)

Le mésylate d'**Imatinib** est un dérivé de la 2-phénylaminopyrimidine qui se lie au site d'adénosine triphosphate (ATP) d'un groupe choisi de protéines tyrosine kinases, empêchant ainsi l'activité de la liaison à l'ATP et inhibant la kinase. Le mésylate d'imatinib est un puissant inhibiteur du BCR-Abl kinases, c-Kit, PDGFR, et fms. Il s'agit actuellement du traitement «de référence» pour la leucémie myéloïde chronique (LMC) chromosomique positive de Philadelphie en phase chronique et pour les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) [53].

La tyrosine kinase c-kit (CD117) est un récepteur de facteur de croissance normalement exprimé dans une variété de cellules humaines. Des mutations de c-kit ont été identifiées dans un grand nombre de tumeurs malignes humaines, et d'abord, le succès thérapeutique a été rapporté en inhibant le c-kit muté avec le mésylate d'Imatinib dans les tumeurs stromales gastro-intestinales exprimant c-kit (GIST). Plusieurs autres inhibiteurs du c-kit ont été développés, et il existe un fort intérêt pour l'identification des entités tumorales avec des mutations activant c-kit [54].

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), un puissant agent chimioattractif pour les CMLV, est codé par 4 gènes : PDGF-A, -B, -C et -D. Parmi ceux-ci, seul le PDGF-BB peut se lier à tous les récepteurs PDGF homo- ou hétérodimériques (PDGF-Rs). La liaison du PDGF-BB au PDGF-R active diverses molécules de signalisation en aval, y compris celles de la phosphatidylinositol 3 kinase

(PI3K) / Akt, de la phospholipase C (PLC) - γ 1 et des voies extracellulaires de kinase régulée par le signal (ERK) 1/2 [55].

4.1.2.3. ALK

Plusieurs années se sont écoulées avant le dévoilement de la tyrosine kinase du récepteur ALK (RTK), qui se compose d'un domaine de liaison au ligand extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire tyrosine kinase. Alors que le domaine tyrosine kinase de l'ALK humaine partage un niveau élevé de similitude avec celui du récepteur de l'insuline (IR), le domaine extracellulaire ALK (ECD) est unique parmi la famille RTK, contenant une région riche en glycine, une lipoprotéine de basse densité domaine de récepteur de classe A (LDLa) et de la méprine, de la protéine A-5 et du récepteur de la protéinostosine phosphatase mu (MAM) domaines.

Deux inhibiteurs de la tyrosine kinase ALK (TKI), le **Crizotinib** et le **Ceritinib**, sont actuellement approuvés en Europe pour l'utilisation dans les Cancer Pulmonaire Non à Petites Cellules (CPNPC) ALK positifs et plusieurs autres sont en cours de développement. Ces ALK TKI se lient légèrement différemment dans la poche de liaison ATP du domaine de l'ALK kinase et sont associés à l'émergence de différents schémas de mutation de résistance pendant le traitement. Ceci souligne la nécessité d'adapter la séquence des ALK TKI en fonction de la signature ALK de chaque patient. La recherche sur les fonctions oncogènes de l'ALK et le développement rapide des inhibiteurs de l'ALK a considérablement amélioré les résultats chez les patients atteints de CPNPC ALK positif. On dispose de peu de données sur l'activation physiologique de la signalisation ALK stimulée par des ligands physiologiques et des recherches supplémentaires sont nécessaires. Comprendre le rôle de l'ALK dans la biologie tumorale est essentiel pour optimiser davantage les stratégies thérapeutiques pour les maladies ALK-positives [56].

4.1.2.4. VEGFR

Il a été démontré que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et son récepteur (VEGFR) jouent un rôle majeur non seulement dans l'angiogenèse physiologique mais aussi dans la plupart des pathologies, telles que le cancer. Le VEGF appartient à la famille des supergènes PDGF caractérisée par 8 cystéines conservées et fonctionne comme une structure homodimère. VEGF-A régule l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire en activant 2 récepteurs, VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR / Flk1 chez la souris). D'autre part, VEGF-C / VEGF-D et leur récepteur, VEGFR-3 (Flt-4), régulent principalement la lymphangiogenèse. La famille VEGF comprend d'autres variants intéressants, dont l'un est le VEGF-E codé par un virus et un autre est spécifiquement exprimé dans le venin du serpent habu (*Trimeresurus flavoviridis*). Les VEGFR sont de loin liés à la famille PDGFR ; cependant, ils sont uniques en ce qui concerne leur structure et leur système de signalisation. Contrairement aux membres de la famille PDGFR qui stimulent fortement la voie PI3K-Akt vers la prolifération cellulaire, VEGFR-2, le principal transducteur de signal pour l'angiogenèse, utilise préférentiellement la voie PLC γ -PKC-MAPK pour la signalisation. Le système VEGF-VEGFR est une cible importante pour la thérapie anti-angiogénique dans le cancer et est également un système attractif pour la thérapie pro-angiogénique dans le traitement de la dégénérescence neuronale et des maladies ischémiques.

Des médicaments anti-VEGF-VEGFR tels qu'un anticorps neutralisant anti-VEGF-A et des inhibiteurs de la tyrosine kinase ont été développés, et le **Bevacizumab** (anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF-A) a été approuvé pour le traitement du colorectal, cancers du sein, du poumon (type non à petites cellules) et rénaux, ainsi que pour les patients atteints de glioblastome. Les inhibiteurs de la multikinase tels que le **Sorafenib** et le **Sunitinib** sont maintenant approuvés pour les patients atteints de cancer rénal et hépatique. En plus de ces médicaments, d'autres qui ciblent le système VEGF-VEGFR, y compris VEGF-Trap (une protéine de fusion des domaines de

liaison VEGFR-1 et VEGFR-2 ligand), anti-VEGFR-1 ou anti-VEGFR-2 anticorps neutralisant , la thérapie par le vaccin peptidique soluble VEGFR-3, VEGFR-1 ou VEGFR-2, et l'anticorps anti-PlGF, ont été développés et font l'objet d'essais précliniques et cliniques [57].

4.1.2.5. IGF1-R

Les récepteurs du facteur de croissance de type insuline (IGFRs) sont des récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinase. Le récepteur IGR de type 1 (IGF-1R) est capable de lier les ligands IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) et IGF-2. Il partage 84 % d'homologie avec le récepteur à l'insuline (IR) [58]. Le récepteur IGR de type 2 lie uniquement l'IGF-2 et ne possède pas de domaine tyrosine kinase. L'activation des récepteurs IGF-1R et IR conduit à l'activation en aval des voies Raf/MEK/ERK et PI3K/Akt favorisant la prolifération cellulaire, la survie et la formation de métastases.

Par conséquent, la sur activation de ces récepteurs est impliquée dans de nombreux cancers comme le sein, la prostate, le côlon, le pancréas, le foie et les mélanomes [59].

Une stratégie permettant de cibler uniquement les récepteurs IGF-1R ne serait pas suffisante pour bloquer l'activation des voies médiées par les ligands IGF et le récepteur à l'insuline (IR) devrait aussi être ciblé. Cependant à cause de son rôle important dans l'homéostasie du glucose, la stratégie idéale serait de cibler les récepteurs IGFR et IR uniquement dans les cellules tumorales pour éviter de potentielles complications telles que l'apparition de diabète de type 2.

De nos jours, il n'existe que des inhibiteurs dirigés contre l'IGF-1R en phase clinique. 5 anticorps monoclonaux sont en cours d'évaluation, le plus avancé est le **CP-721, 871** qui en phase III pour les cancers du poumon non à petites cellules et en phase II pour les cancers du sein, colorectal, de la prostate et le sarcome d'Ewing. Parmi les molécules inhibitrices, trois sont en phase I : **XL-228**, **OSI-906**, et l'**Acide Nordihydroguaiarétique**.

4.1.2.6. HGF et son récepteur MET

c-Met est un récepteur transmembranaire tyrosine kinase impliqué dans la régulation de la mobilité, la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire [60]. Il lie un seul ligand le facteur de croissance hépatocyte (HGF), ce qui induit le recrutement à la membrane de plusieurs protéines effectrices, principalement : Gab1, Grb2 et PI3K. c-Met contribue à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont les principales sont les voies Raf/MEK/ERK et PI3K/Akt. Des mutations génétiques du gène codant pour le récepteur (le proto-oncogène MET), la surexpression de MET ou une stimulation anormale du récepteur sont à l'origine de sa suractivation.

Plusieurs mutations oncogéniques ont été identifiées dans plusieurs types de cancers (estomac, rein, poumon) ce qui fait de c-Met une cible thérapeutique très attractive [61].

Plusieurs inhibiteurs sont actuellement en phase clinique dont deux anticorps monoclonaux anti-HGF (AMG-102, OA-5D5) en phase I et quatre molécules parmi lesquelles XL-880 qui est en phase I/II pour les cancers du rein, de l'estomac et du cou. XL-880 a la particularité d'inhiber plusieurs RTKs : c-Met, VEGFR-2, PDGFR- β , Kit, FLT3, Tie-2 et Ron.

4.2.2. Thérapie ciblée visant la voie de signalisation sous membranaire

4.2.2.1. Voie PI3K/AKT/mTOR

4.2.2.1.1. Rappel physiologique

La voie de la **phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / AKT / cible mammalienne de la rapamycine (mTOR)** est fréquemment modifiée dans les cas de cancer¹, favorisant la croissance, la prolifération et la survie [62, 63]. Ciblant ses trois principaux nœuds (PI3K, AKT et mTOR) représente donc une opportunité thérapeutique clé[62]. Les PI3K de classe IA sont des hétérodimères constituant une sous-unité régulatrice (p85) et catalytique (p110) et existent sous quatre isoformes (a, b, g et d) avec expression tissulaire différentielle¹. Croissance La stimulation par facteur des récepteurs tyrosine

kinases déclenche l'activation de la PI3K, l'activation en aval de la kinase 1 dépendante du phosphoinositide (PDK1) et l'AKT, puis du complexe mTOR 1 (mTORC1), qui favorise la croissance cellulaire et la synthèse protéique.² La protéine ribosomale S6 du substrat mTORC1 la kinase (p70S6K) phosphoryle la protéine S6 ribosomale, stimulant la synthèse des protéines, et renvoie au substrat 1 du récepteur de l'insuline afin de réguler négativement l'activation de la voie PI3K induite par l'insuline. La voie peut être activée par des récepteurs couplés aux protéines G ou par des protéines oncogéniques telles que RAS[62]. L'homologue suppresseur de tumeur phosphatase et tensine (PTEN) est un régulateur négatif clé de la voie PI3K[63]. D'autres incluent l'inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II (INPP4B) [64] et la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur 12 (PTPN12 / PTP-PEST) [65].

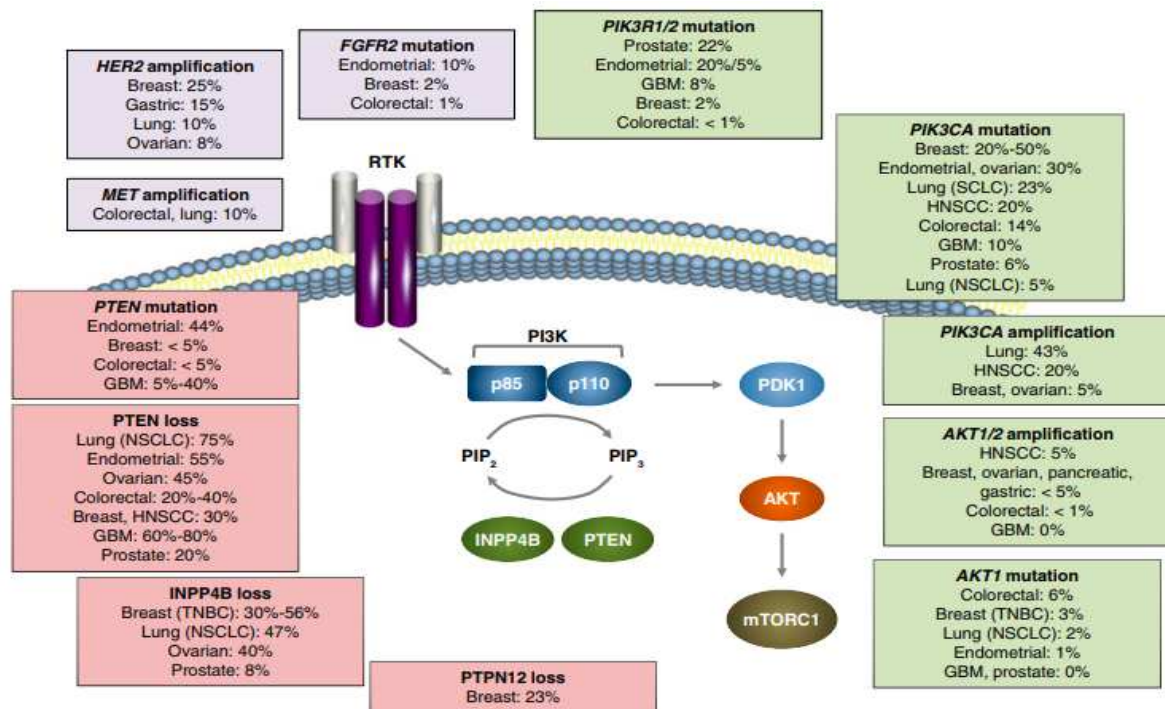


Figure 16 : Aberrations de la voie PI3K communes trouvées dans une variété de types de tumeurs solides.

[66]

L'activation de la voie PI3K contribue à la croissance tumorale, à la survie et à la résistance aux thérapies anticancéreuses. FGFR2, récepteur 2 du facteur de croissance des fibroblastes; GBM, glioblastome multiforme; HER2, récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain; HNSCC, carcinome épidermoïde de la tête et du cou; INPP4B, inositol polyphosphate 4-phosphatase de type II; MET, récepteur du facteur de croissance des hépatocytes; mTORC, cible mammalienne du complexe de rapamycine; NSCLC, cancer bronchique non à petites cellules; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3, le 3,4,5-trisphosphate de phosphatidylinositol; PTEN, homologue phosphatase et tensin; PTPN12, protéine tyrosine phosphatase non-récepteur 12; RTK, récepteur tyrosine kinase; CPPC, cancer du poumon à petites cellules; TNBC, cancer du sein triplégatif .

4.2.2.1.2. Exemples

4.2.2.1.2.1. PI3K

Wortmannin et **LY294002** sont deux inhibiteurs de la PI3K de première génération bien connus. **Wortmannin** est un produit naturel isolé de **Penicillium wortmannii** qui se lie de manière irréversible aux enzymes PI3K par modification covalente d'une lysine nécessaire à l'activité catalytique. **LY294002** (laboratoires Lilly Research) a été le premier inhibiteur synthétique de type molécule capable de cibler de manière réversible les membres de la famille PI3K à des concentrations comprises dans la gamme micromolaire. Cependant, le **wortmannin** et le **LY294004** ont peu ou pas de sélectivité pour les isoformes de PI3K et présentent une toxicité considérable chez les animaux [67, 68]. Malgré leurs limites, les études précliniques de ces inhibiteurs de la PI3K à large spectre ont grandement contribué à la compréhension de l'importance biologique de la signalisation de la PI3K et ont fourni une plateforme pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de la PI3K.

Un nombre de chimotypes d'inhibiteurs de la PI3K, affichent une sélectivité différentielle pour les isoformes[68, 69]. Une étude récente de Knight et al [69] a présenté une comparaison parallèle des profils de sélectivité isoforme parmi une

collection d'inhibiteurs de la PI3K puissants et structurellement divers, soulignant le rôle critique de la signalisation de l'insuline p110 α et fournissant également des informations importantes pour le développement des inhibiteurs isoforme-sélectifs de PI3K. Par la suite, il a été démontré que PI-103, un inhibiteur spécifique de p110 α , avait un effet puissant en bloquant la signalisation de PI3K dans les cellules de gliome via son aptitude à inhiber à la fois PI3K α et mTOR[70]. Les effets apparemment non ciblés de PI-103 sur les complexes mTOR ont ouvert, dans notre recherche, une nouvelle stratégie efficace de traitement du cancer reposant sur l'inhibition combinatoire de mTOR et de PI3K.

À l'heure actuelle, un certain nombre de composés ciblés par PI3K font actuellement l'objet d'essais cliniques (TABLEAU 2), dont beaucoup sont des inhibiteurs doubles de PI3K / mTOR[71]. **BEZ235** (Norvatis) est un dérivé d'imidazaoquinazoline qui inhibe plusieurs isoformes de classe I PI3K et l'activité de la kinase mTOR[71]. Le **BGT226** (Norvatis) est un autre puissant inhibiteur de pan-PI3K / mTOR. Se distinguant de **BEZ235** et **BGT226**, **BKM120** (Norvatis) est sélectif pour les enzymes PI3K de classe I sans activité inhibitrice de mTOR. **XL765** et **XL147** sont des inhibiteurs de la PI3K de classe I d'Exelixis (XL765 cible également mTOR), tous deux sont des dérivés de la quinoxaline, comme le révèlent leurs structures récemment révélées[68]. **GDC0941** (Piramed / Gnetech) est un dérivé de PI-103 qui est actif contre toutes les isoformes de PI3K de classe I dans une plage nanomolaire. **GSK1059615** (GlaxoSmithKline), un autre candidat clinique ciblant PI3K. **SF1126** (Semafore) est un conjugué covalent de **LY294002** avec un peptide RGD (arg-gly-asg) conçu pour une solubilité accrue et une libération accrue du médicament actif dans la tumeur [72], dans les études précliniques, il a été démontré que le SF1126 avait de puissants effets inhibiteurs sur la croissance cellulaire, la prolifération et l'angiogenèse avec une toxicité réduite par rapport au parent LY294002. Le **SF1126** est entré dans un essai clinique de phase I en tant qu'inhibiteur de la PI3K / mTOR dans un large éventail de cancers à tumeur solide. Un certain nombre de composés qui ciblent préférentiellement

des isoformes sélectionnées de PI3K de classe I sont également en cours de développement, par exemple, **PX-866** (Oncothyreon) cible p110 α , p110 δ et p110 γ , tandis que **CAL-101** (Calistoga) est un inhibiteur sélectif de p110 γ [73].

4.2.2.1.2.2. AKT

En tant que nœud proximal le plus crucial en aval du complexe RTK / PI3K, AKT est une autre cible thérapeutique attrayante. Un grand nombre d'inhibiteurs de l'AKT ont été développés, qui peuvent être regroupés dans un certain nombre de classes comprenant des analogues de phosphatidylinositol (PI) à base de lipides, des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et des inhibiteurs allostériques. L'inhibiteur le plus avancé sur le plan clinique, **Perifosine**, est un analogue de l'IP basé sur les lipides qui cible le domaine PH de l'AKT, empêchant ainsi la liaison au PIP3 et donc à sa translocation membranaire [74]. Il fait actuellement l'objet d'essais cliniques seul ou en association avec divers médicaments pour traiter plusieurs types de cancers. D'autres inhibiteurs du domaine de l'AKT PH, notamment le **PX316** [75], ont montré des effets inhibiteurs sur la croissance des cellules tumorales présentant une activité élevée de la PI3K / AKT[76].

La plupart des inhibiteurs de l'AKT, qui sont des petites molécules compétitives, sont non sélectifs et ciblent les trois isoformes de l'AKT. **GSK690693** (GlaxoSmithKline) est un inhibiteur de la kinase AKT, compétitif pour l'ATP, qui cible les 3 isoformes de la AKT à faible gamme nanomolaire et est également actif contre les kinases supplémentaires de la famille des AGC kinases [77].

XL418 (Exelixis), une petite molécule qui inhibe l'activité des AKT et S6K avec une activité antinéoplasique dans les études précliniques, fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase I chez les patients présentant une tumeur solide avancée. Le **VQD-002** (phosphate de tricitabinemonohydraté ou TCN-P, VioQuest), un nucléotide tricyclique hydrosoluble est actuellement testé dans des essais cliniques de phase I chez des patients présentant à la fois des hémopathies malignes solides et hématologiques. Il a récemment été signalé que le **TCN-P** pourrait jouer un rôle dans

l'inversion de la résistance aux médicaments dans le cancer de l'ovaire chez les patientes préalablement traitées par chimiothérapie [78]; Cependant, son mécanisme d'action n'est pas clair.

4.2.2.1.2.3. mTOR

Bien que mTOR n'ait été défini que récemment comme membre de la voie PI3K, il s'agit du premier nœud de la voie ciblée dans la clinique. **La rapamycine** (également connu sous le nom de **sirolimus**, **Rapamune®**, Wyeth), l'inhibiteur prototypique de mTOR, est un produit naturel dérivé de bactéries utilisé à l'origine en tant qu'agent antifongique [79] et ultérieurement reconnu comme immunosuppresseur et, plus récemment encore, comme antinéoplasique [80]. Des analogues de la rapamycine, tels que **CCI-779** (également connu sous le nom de **temsirolimus**, **Torisel®**, Wyeth), **RAD001** (également appelé **everolimus**, **Afinitor®**, Novartis) et **AP23573** (également connu sous le nom de **deforolimus**, **Merk / Ariad**) ont été développés en tant qu'anti-médicaments contre le cancer. Ces analogues de la rapamycine, parfois appelés rapalogues, inhibent mTOR par le même mécanisme que la rapamycine, mais possèdent de meilleures propriétés pharmacologiques pour une utilisation clinique dans le cancer. Les résultats encourageants d'études cliniques récentes portant simultanément sur **CCI-779** et **RAD001** utilisés en monothérapie ont montré que les médicaments ciblant mTOR amélioreraient la survie des patients atteints d'un carcinome rénal avancé, ce qui les conduisait à leur approbation clinique dans cette indication (RCC) [81-84]. Les résultats avec les inhibiteurs de mTOR dans de nombreux autres types de tumeurs, y compris le cancer du sein avancé et le gliome, ont donné un faible taux de réponse [81].

Notamment, mTOR représente également une seconde cible potentielle via son complexe mTORC2, qui joue le rôle de PDK2 responsable de la phosphorylation du carboxyle terminal de AKT chez ser473, un événement obligatoire nécessaire à la pleine activation [85]. Bien que l'importance clinique de la fonction de PDK2 dans le cancer soit inconnue, une étude récente a montré que mTORC2 était nécessaire au

développement des tumeurs de la prostate induites par la perte de PTEN [86]. Deux inhibiteurs de mTOR compétitifs pour l'ATP, **OSI-027** (OSI Pharmaceuticals) et **AZD8055** (AstraZeneca) font actuellement l'objet d'essais cliniques chez des patients atteints de tumeurs solides et d'un lymphome à un stade avancé.

4.2.2.2. Voie RAF/MEK/ERK

4.2.2.2.1. Rappel physiologique

La voie MAP Kinase est une voie essentielle de régulation de croissance cellulaire, de transformation et d'apoptose. Un des principaux composants est la kinase Raf dont le rôle est de transformer le signal provenant de Ras dans une cascade de kinases cytoplasmiques par phosphorylation et activation. Une fois activée, Ras va concourir au recrutement des kinases RAF (A-RAF, B-RAF et RAF-1) vers la membrane cellulaire. À leur tour activées, les kinases RAF vont entraîner une cascade de phosphorylation impliquant les protéines MEK (MEK1 et MEK2) puis ERK (ERK1 et ERK2) qui portent une activité tyrosine-kinase et une activité sérine/ thréonine-kinase. L'activation de la voie RAF/MEK/ERK par la liaison aux récepteurs liés à HIF (VEGFR, EGFR et PDGFR) concourt à la stimulation de la prolifération cellulaire mais également à la diminution de l'apoptose en interagissant avec des protéines de la famille Bcl-2 ou ASK-1 [87].

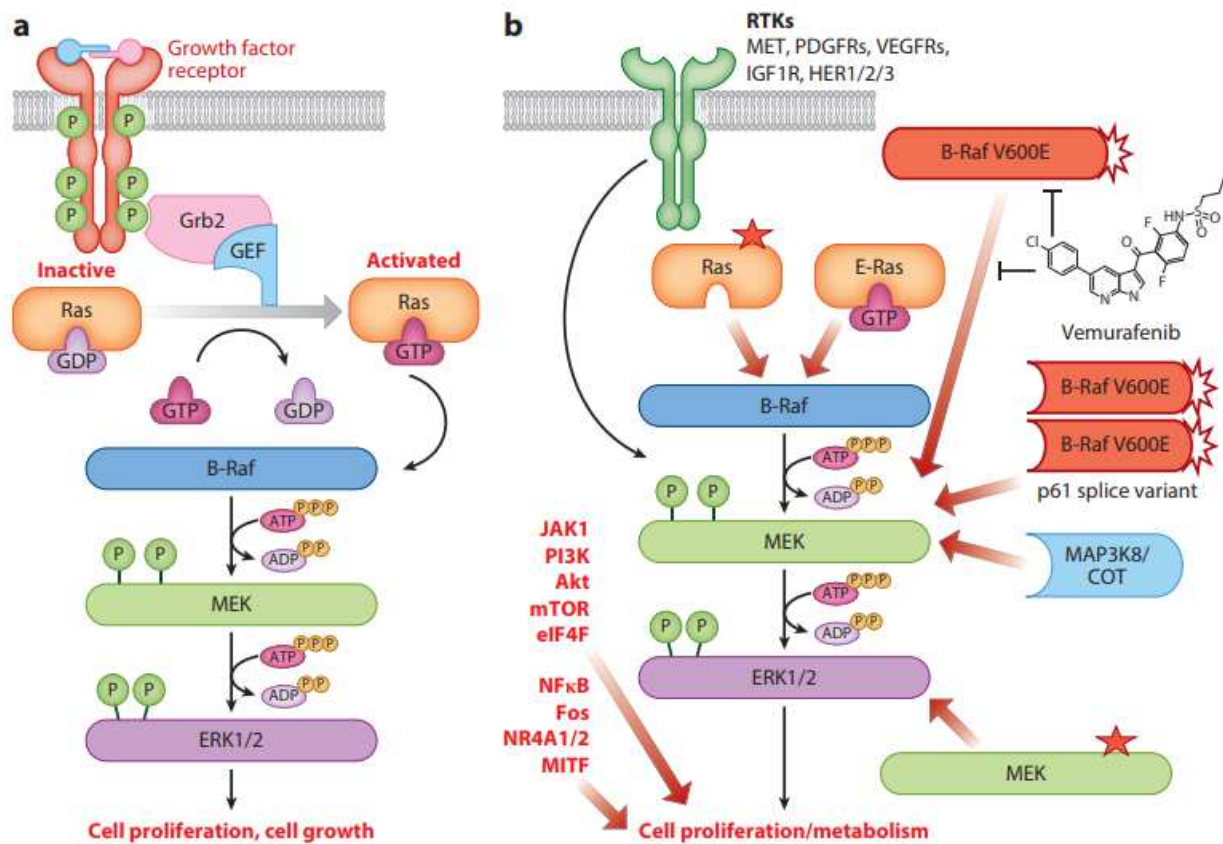


Figure 17 : Mécanisme de fonctionnement des voies RAF/MEK/ERK

(a) La cascade $\text{Ras} \rightarrow \text{Raf} \rightarrow \text{MEK} \rightarrow \text{MAPK} / \text{ERK}$ transmet les signaux de stimulation mitogènes et autres des récepteurs de la membrane cellulaire au noyau, facteurs de transcription phosphorylants tels que Elk-1 et Myc. La même cascade phosphoryle également de nombreuses protéines cytoplasmiques afin de réguler les processus cellulaires clés et les décisions en matière de devenir des cellules, notamment la prolifération, la survie, la différenciation, l'expression des gènes, le cytosquelette et le métabolisme. (b) Les mutations somatiques de BRAF, le plus souvent V600E, conduisent à une activité kinase constitutive. BRAF est un véritable oncogène et une cible thérapeutique. Les inhibiteurs de B-Raf ont démontré une activité clinique contre les mélanomes mutants de BRAF, mais la résistance apparaît rapidement, en raison d'une multitude de mécanismes d'évasion / de survie qui devront être traités avec des schémas thérapeutiques combinatoires. L'association d'un inhibiteur de B-Raf et d'un inhibiteur de MEK a déjà été approuvée par la US Food and Drug Administration[88].

4.2.2.2.2. Exemples

4.2.2.2.2.1. RAF

Le **sorafénib** (BAY43-9006, **Nexavar**) est un inhibiteur multi-kinase biodisponible par voie orale (ciblant VEGFR-1, -2 et -3, PDGFR, RET et Raf kinases), approuvé par la FDA pour le traitement de l'insuffisance rénale, hépatocellulaire, et cancer thyroïdien différencié réfractaire à l'iode radioactif (sous-types papillaire, folliculaire et de Hurthle). Bien que le **sorafenib** ait une activité inhibitrice contre les kinases Raf, son effet " sur B-Raf est plutôt faible et son efficacité clinique est généralement attribuée au ciblage des kinases non-B-Raf[88].

4.2.2.2.2.2. MEK

Deux inhibiteurs de la MEK, le **tramétinib** et le **cobimétinib**, ont été approuvés par la FDA et l'Agence européenne des médicaments (EMA).

Le **tramétinib** (GSK1120212) a été le premier inhibiteur de la MEK approuvé par la FDA (mai 2013) pour le traitement du mélanome. Il s'agit d'un inhibiteur allostérique

non compétitif avec l'ATP et ayant une activité sous-nanomolaire contre les kinases MEK1 et MEK2 purifiées.

Le deuxième inhibiteur de MEK approuvé était le **cobimétinib (GDC-0973, XL518)**, mis au point par Exelixis et Genentech (Roche). En 2014, la FDA a attribué à ce composé le statut de médicament orphelin pour le mélanome malin avec la mutation BRAFV600, puis le traitement d'association avec le **vémurafénib** pour le mélanome métastatique non résectable avec la mutation BRAF V600E ou V600K en novembre 2015[89].

4.2.2.2.3. ERK

Jusqu'à ce jour, il n'y a aucun inhibiteur connu en phase clinique malgré la connaissance de plusieurs inhibiteurs sélectifs de ERK et la disponibilité de la structure cristallographique de ERK2 [90-93]. La question de savoir si un inhibiteur de l'ERK deviendra un jour un médicament anticancéreux reste ouverte et les efforts se poursuivent pour mieux comprendre comment ERK régule la prolifération cellulaire et l'apoptose [94].

4.2.2.2.4. RAF

Les protéines kinases Raf sont des sérine/thréonine kinases, 3 isoformes sont actuellement connues chez les mammifères : A, B et C-Raf aussi appelée Raf-1 [95]. Les protéines Raf-1 et B-Raf sont des cibles thérapeutiques de choix contre le cancer et plusieurs stratégies sont actuellement développées pour les inhiber telles que : les oligonucléotides anti-sens, les petites molécules inhibitrices de l'activité kinase, les inhibiteurs de l'interaction Raf-Ras et les composés qui déstabilisent la protéine Raf [96-99].

4.2.2.3. Inhibiteurs protéosomes

La voie du protéasome de l'ubiquitine a été découverte dans les années 1980 comme un élément central de la machinerie de dégradation des protéines cellulaires jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie, notamment la prévention de l'accumulation de protéines mal repliées ou délétères. Les cellules cancéreuses produisent des protéines

qui favorisent la survie et la prolifération cellulaires et / ou inhibent les mécanismes de la mort cellulaire. Cette notion a ouvert la voie aux tests précliniques des inhibiteurs du protéasome comme moyen de déplacer cet équilibre fin vers la mort cellulaire. Depuis la fin des années 90, des essais cliniques ont été menés sur diverses tumeurs malignes, conduisant à l'approbation réglementaire des inhibiteurs du protéasome pour le traitement du myélome multiple et du lymphome à cellules du manteau. Les inhibiteurs du protéasome de première génération et de deuxième génération peuvent provoquer des réponses initiales profondes chez les patients atteints de myélome, chez qui ces médicaments ont considérablement amélioré les résultats, mais les rechutes sont fréquentes et une résistance acquise au traitement apparaît. De plus, les données précliniques prometteuses obtenues avec des inhibiteurs du protéasome dans des modèles de tumeurs solides n'ont pas été confirmées en clinique, ce qui indique que la résistance primaire joue un rôle important. Il est donc essentiel d'étudier les mécanismes de résistance pour maximiser davantage l'utilité de cette classe de médicaments à l'ère de la médecine personnalisée.

Les inhibiteurs du protéasome ont été initialement développés en tant qu'agents potentiellement bénéfiques pour la prévention de la cachexie liée au cancer, en raison du rôle de l'UPP dans le renouvellement des protéines. De nombreuses études précliniques ont alors émergé, montrant que les inhibiteurs du protéasome à petites molécules pouvaient induire l'apoptose dans les lignées de cellules en culture et les modèles murins de cancer, ce à quoi leur utilité en tant que chimiothérapeutique était postulée. L'une des premières hypothèses à la base de l'étude de ces agents était qu'ils pourraient inhiber la signalisation de NF-KB en bloquant la dégradation de l'inhibiteur de NF-KB, empêchant ainsi la translocation nucléaire de NF-KB. Cette logique a conduit au développement du **bortézomib**, un inhibiteur du protéasome de première génération, puis à celui d'agents de deuxième génération, notamment le **carfilzomib**, l'**ixazomib** et l'**oprozomib**, développés en partie pour tenter d'améliorer les bénéfices observés avec **bortézomib**[100].

Inhibiteurs de protéasome de première génération

Les inhibiteurs du noyau protéolytique 20S du protéasome sont les inhibiteurs de protéasome les plus étudiés à ce jour. Trois de ces agents (**bortézomib**, **ixazomib** et **carfilzomib**) sont actuellement approuvés pour le traitement du myélome multiple ou du lymphome à cellules du manteau (MCL). Le **bortézomib** a été le premier inhibiteur du protéasome à être utilisé en clinique.

Inhibiteurs du protéasome de deuxième génération

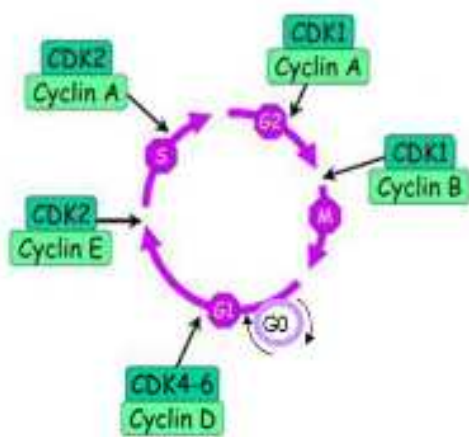
Un certain nombre de pharmacophores différents ont été décrits comme pouvant interagir avec les résidus thréonine N-terminaux dans les sous-unités catalytiques du protéasome responsables des attaques nucléophiles impliquées dans le clivage des liaisons peptidiques. Comme pour les acides boroniques (qui incluent le **bortézomib** et l'**ixazomib**), les époxycétones peuvent également se lier à ces thréonines N-terminales ; Cependant, contrairement aux boronates, qui se lient de manière réversible, les époxycétones forment des liaisons irréversibles pouvant prolonger la durée de l'inhibition du protéasome. La possibilité d'une longue durée d'inhibition a justifié les études de phase I sur le **carfilzomib** (connu auparavant sous le nom de PR-171), qui ont révélé que cet agent est à la fois tolérable et actif contre le myélome multiple récidivant et / ou réfractaire, même chez certains avaient déjà reçu un traitement par **bortézomib**. Par la suite, le **carfilzomib** a été approuvé de manière accélérée en 2012 par la FDA en tant qu'agent unique pour le traitement du myélome multiple chez les patients ayant reçu au moins deux traitements antérieurs et dont la maladie était réfractaire au traitement le plus récent. La décision d'approbation était basée sur les résultats d'une étude portant sur un seul groupe de 266 patients, chez lesquels le **carfilzomib** avait été administré aux jours 1, 2, 8, 9, 15 et 16 des cycles de 28 jours à 20 mg / m² au cours du premier cycle, et ensuite à 27 mg / m², à partir du deuxième cycle, pour un maximum de 12 cycles (calendrier 20/27). Un ORR de 23,7% a été rapporté, incluant une réponse complète et 13 très bonnes réponses partielles (VGPR;

les critères de détermination des réponses ont été définis ailleurs), avec une durée médiane de réponse (DOR) de 7,8 mois [100].

4.2.3. Thérapie ciblée agissant au niveau nucléaire

4.2.3.1. Les cyclines

Les mécanismes de la régulation du cycle cellulaire reposent essentiellement sur deux structures protéiques complémentaires : les protéines appelées CDK pour cycline-dépendent kinase et les cyclines (**Figure 15**)[101].



G1 : croissance, préparation à la réplication

S : réplication de l'ADN

G2 : croissance, préparation à la mitose

M : mitose (division cellulaire)

G0 : cellule au repos, hors du cycle cellulaire

Figure 18 : Régulation du cycle cellulaire par les cyclines-dépendents kinases (CDKs)[101]

La CDK2 régule le passage de la phase G1 à la phase S, CDK4 et CDK6 régulent le passage de la phase G0 à la phase G1. La CDK1 régule le passage des cellules en mitose (phase M). CDK7, CDK8 et CDK9 sont impliquées dans la régulation de la transcription. Une dizaine de cyclines participent à la régulation du cycle, elles appartiennent à 4 classes : les cyclines A, B, D et E. Dans les cancers, plusieurs événements génétiques et épigénétiques sont à l'origine d'une surexpression, de l'absence des cyclines ou d'une diminution du niveau d'expression des inhibiteurs de CDKs[102]. Plusieurs travaux ont montré que l'expression d'inhibiteurs de CDKs entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules[103].

C'est à partir de ces observations que le développement pharmacologique des inhibiteurs de CDKs a commencé, dans le but de favoriser l'apoptose des cellules tumorales[104].

Les inhibiteurs de CDKs de première génération sont des inhibiteurs ATP compétitifs. Parmi eux, le **flavopiridol** et la (R)-**roscovitine** (**CYC-202**) sont en phases II et III pour un grand nombre de cancers.

Du fait de certains résultats décevants obtenus en phase II, une seconde génération d'inhibiteurs ont été développés [105].

Ils sont actuellement en phase I et II. Parmi eux se trouve SNS-032 (Figure 39) et AT-7519. D'autres inhibiteurs de type peptidique non ATP compétitifs et plus spécifiques vis-à-vis des CDKs sont actuellement en phase préclinique (CIP, NBI1) [104].

4.2.3.2. Kinases Aurora

Chaque cellule fille doit hériter en sortie de mitose d'un seul centrosome et d'un génome parfaitement diploïde. Une mitose anormale produit des cellules aneuploïdes contenant un nombre anormal de centrosomes, deux caractères qui sont devenus des signatures de cellules tumorales [106].

La famille Aurora, qui compte trois sérine/thréonine kinases (A, B et C) chez l'homme, est impliquée dans la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse[107].

Ces trois protéines sont surexprimées dans un grand nombre de tumeurs caractérisées par une aneuploïdie et une amplification des centrosomes. Parmi ces trois kinases, seule Aurora-A possède un réel potentiel oncogénique en particulier dans les cancers du sein [108]et les cancers colorectaux [109].

Plusieurs inhibiteurs sont actuellement évalués en phases cliniques. Parmi eux, **AZD-1152** est un inhibiteur sélectif d'Aurora-B [110], il est en phase II pour le traitement des leucémies. **MK-0457** (**VX-680**) est un inhibiteur ATP compétitif ciblant les 3 isoformes d'Aurora, il est actuellement en phase I [111].

4.2.4. Thérapie ciblée agissant sur l'environnement tumoral

4.2.4.1. Les antiangiogéniques

À ce jour, les exemples les plus réussis de thérapie ciblée dans le cancer gynécologique se trouvent dans le domaine de l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus clé pour l'apport en nutriments, en oxygène, en facteurs de croissance et pour la dissémination d'une tumeur. Ainsi, le développement d'un nouveau système vasculaire est un processus essentiel pour qu'une tumeur puisse dépasser une taille de 1 mm. Il existe deux mécanismes principaux pour la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans le microenvironnement normal et le microenvironnement tumoral.

La germination, le principal moyen de formation des vaisseaux, est la ramification d'un nouveau bateau deun vaisseau sanguin établi.

L'autre mécanisme majeur est la non-germination, ce qui se produit lorsqu'un vaisseau sanguin existant grossit et se scinde en deux vaisseaux distincts. Les cellules tumorales agressives peuvent également développer des canaux microvasculaires pour soutenir la néovascularisation dans un processus connu sous le nom de mimétisme vasculogène. Finalement, les vaisseaux existants dans le tissu hôte peuvent être cooptés par les tumeurs pour augmenter l'apport vasculaire. Dans les tissus normaux, le système vasculaire est organisé et de taille et de forme uniformes. L'angiogenèse dans le microenvironnement tumoral a pour résultat des vaisseaux plus irréguliers, semblant tortueux, dilatés et présentant des fuites. La régulation des mécanismes angiogéniques est assurée par un ensemble complexe de facteurs de croissance qui stimulent et inhibent la croissance vasculaire en réponse à des stimuli internes et externes. En général, ces facteurs agissent sur les cellules qui tapissent le vaisseau sanguin (les cellules endothéliales) pour réguler l'activité dans le microenvironnement cellulaire. Dans le microenvironnement cellulaire normal, les cellules endothéliales sont stables et se divisent rarement. L'angiogenèse pathologique consécutive à une augmentation des facteurs pro-angiogéniques entraîne la formation de cellules endothéliales présentant une division et une croissance non régulées. En fait, une forte expression de

molécules pro-angiogéniques et une densité de microvaisseaux accrue (un marqueur de la vascularisation tumorale accrue) sont des facteurs pronostiques médiocres dans de nombreuses tumeurs malignes solides[112].

4.2.4.2. Les inhibiteurs métalloprotéases

L'angiogenèse est un événement essentiel dans la croissance tumorale. Elle se définit comme l'ensemble des processus cellulaires et moléculaires aboutissant à la formation de néovaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant.

Un des facteurs de croissance de l'angiogenèse les plus étudiés, le vascular endothelial growth factor (VEGF), est synthétisé par les cellules tumorales, puis se fixe sur des récepteurs (VEGFR) situés sur les cellules endothéliales. L'hypoxie est un des principaux activateurs de l'expression du VEGF [113]. Il existe trois récepteurs VEGFR qui ont chacun une activité tyrosine-kinase : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. C'est VEGFR-2 qui assure la majorité des effets biologiques du VEGF sur la cellule endothéliale [2]. D'autres facteurs de croissance interviennent dans l'angiogenèse : par exemple, les angiopoïétines, le transforming growth factor-beta (TGF) et le bonemorphogenic protein-9 (BMP9) [114].

Ces différents facteurs et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement antitumoral.

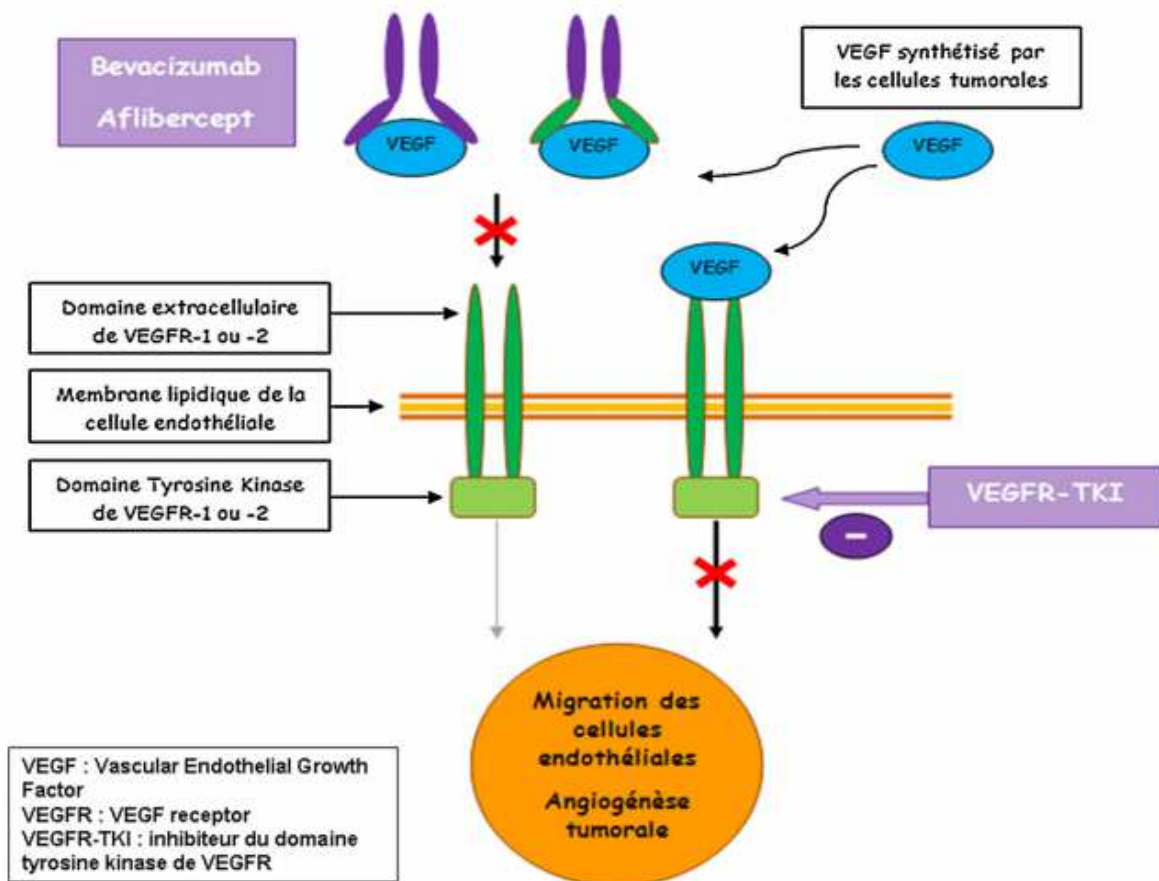


Figure 19 : Mode d'action des thérapies antiangiogéniques ciblant le vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR)
[114]

Beaucoup d'inhibiteurs ont été développés : des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire du VEGFR d'une part et des petites molécules inhibitrices de protéines kinases d'autre part. Parmi les anticorps, le **bevacizumab**[115] (**Avastin®**) a été approuvé par la FDA pour traiter les cancers du sein, du côlon-rectum, du poumon. D'autres anticorps sont en cours d'évaluation (**Aflibercept**, **IMC-1C11**). Parmi les molécules approuvées, le **Sorafenib**[116] (**Nexavar®**) et le **Sunitinib**[117] (**Sutent®**) sont des inhibiteurs multi kinases (VEGFRs, PDGFR, c-kit, Raf). Le **Sorafenib** est indiqué dans le traitement du cancer du rein avancé, et le carcinome hépatocellulaire, le **Sunitinib** est indiqué pour traiter les tumeurs stromales gastro-intestinales et le cancer du rein. D'autres molécules sont actuellement en phase II : **Vatalanib**, **AMG-706**, **Pazopanib**.

Une nouvelle stratégie pour inhiber l'angiogenèse et la formation de métastases est actuellement en cours d'évaluation clinique [118]. Elle consiste à bloquer l'interaction entre les intégrines et les ligands de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine). Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire, elles sont constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Ce ne sont pas des récepteurs tyrosine kinase mais ces récepteurs sont capables de transmettre des signaux intracellulaires régulant la prolifération, la survie, la migration et l'angiogenèse. Plusieurs antagonistes des intégrines proangiogéniques et prométastatiques : $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$ sont en cours d'évaluation. Il s'agit soit d'anticorps monoclonaux, soit de petites molécules inhibitrices. Parmi les anticorps, le **Volociximab**[119] qui est dirigé contre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est en phase II pour traiter les cancers du pancréas, du poumon non à petites cellules et les mélanomes. Parmi les molécules en cours d'évaluation, la plus avancée est le peptide **Cilengitide** (**EMD-121974**) inhibiteur des intégrines $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$ [120].

Il est en phase II pour le traitement de plusieurs cancers (cerveau, tête et cou, leucémies, mélanomes, prostate).

4. Thérapie génique ciblée

La thérapie génique est la pratique thérapeutique définitive consistant à transférer l'ADN ou l'ARN directement à des cellules *in vivo* ou à des cellules isolées, puis à une réinfusion de ces cellules dans le corps humain. Etant donné que les cancers constituent l'une des menaces les plus graves pour la santé humaine en raison de l'efficacité insatisfaisante et toxicité systémique inévitable des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie traditionnels, la thérapie génique a trouvé ses racines dans le traitement de la néoplasie de tissus divergents. Les cellules cancéreuses pourraient être modifiées avec les gènes de protéines cytotoxiques ou suppresseurs de tumeurs ou avec une classe de protéines gènes suicidaires associés à des promédicaments, qui entraînent tous une mort cellulaire autonome. Sinon, la réponse immunitaire antitumorale pourrait être provoquée par une modification génétique de cellules malignes ou de cellules immunitaires afin de produire des cytokines ou des antigènes tumoraux. Les niveaux d'immunité relativement faibles chez les patients cancéreux, les stratégies qui tuent directement les cellules tumorales sont avantageuses dans le contexte des microenvironnements éduqué par les tumeurs.

Alors que les protéines cytotoxiques telles que les toxines dérivées de bactéries sont capables de déclencher la mort cellulaire par divers mécanismes, elles provoquent souvent une inflammation incontrôlée en raison d'une forte immunogénicité. Grâce à notre compréhension toujours plus claire de l'apoptose au cours des dernières années, les oncologues sont actuellement en mesure d'utiliser système ennemi pour éliminer les cellules néoplasiques. L'apoptose est une mort cellulaire programmée caractérisée par une série de changements morphologiques et biochimiques attribués à des événements moléculaires ou à des cascades de signalisation régulés avec précision. En fait, les médecins avaient atteint l'apoptose des cellules tumorales via : traitement traditionnel beaucoup plus tôt qu'ils ne le savaient. Bien que la chimiothérapie et la radiothérapie aient provoqué une apoptose massive des cellules tumorales, elles tuent également de manière indiscernable les cellules normales. Par conséquent, la mise en

place de protocoles thérapeutiques ciblés pro-apoptotiques développement de médicaments induisant l'apoptose qui ciblent la tumeur sans causer de grave altération de l'organisme normal existe depuis les années 90 et a fourni de nouvelles approches pour le traitement efficace du cancer[121].

3^{ème} Partie :
Biotechnologie,
Thérapie génique
et
Edition génétique

1. Historiques

1.1 . 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 [122].

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

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 [122].

- **Antiquité** : fabrication de pain, de bière, de fromage et de vin.
- **MoyenAge** : distillation de l'alcool issu de la fermentation en Occident.
- **XVIèmesiècle** : formations de corporations d'artisans spécialisés dans la fabrication de la bière.
- **XVIIèmesiècle** : culture des champignons de couche en France (= champignon de Paris « Agaricusbisporus ») grâce à des déchets organiques (fumier).
- **XVIIIèmesiècle** : développement de la chimie, on connaît alors la fermentation alcoolique et on réalise industriellement la production de sucre grâce à la betterave.

Période intermédiaire

C'est le développement des connaissances théoriques [122].

- **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 18) 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 20 : Louis PASTEUR : père de la microbiologie

[123]

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.

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 »[122].

- **XXème siècle**, Découverte et production industrielle de la pénicilline pendant la seconde Guerre Mondiale.

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 génique [122].

1.2. 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 parceque 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 (« Pisumsativum »).

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

En 1935, on parvient à obtenir de l'ADN pur.

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 [122].

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 [122].

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.

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. Le nombre d'essais cliniques de thérapies géniques va alors augmenter considérablement [122].

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 [123].

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 -**). Il semble que ce soit l'objectif thérapeutique des prochaines décennies.

Tableau 7 : Projets de thérapies géniques (environ 300) déposées en 2000 auprès des autorités américaines ou européennes [124]

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%

1.3. Historique de l'édition du génome

En 1901, Sir Archibald Garrod identifia l'alkaptonurie comme la première maladie génétique humaine connue. Aujourd'hui, nous reconnaissons qu'il y a au moins 8 000 maladies humaines causées par des mutations dans des gènes uniques (maladies monogéniques); ce nombre augmente presque chaque jour. Bien que toutes ces maladies soient classées comme "rares", elles peuvent toucher plus de 400 millions de personnes dans le monde. Certaines, comme la drépanocytose, touchent des dizaines de millions de personnes dans le monde et ne sont "rares" que dans certaines parties du monde, notamment aux États-Unis, en Europe et en Asie de l'Est. Pour un petit sous-groupe de patients, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (allo-HSCT) ou la transplantation d'organes solides peut être utilisée pour guérir leur maladie génétique, mais pour la grande majorité des patients, il n'y a pas de remède et, dans les meilleurs des cas, ils sont traités par la prise en charge des symptômes. L'édition thérapeutique du génome est née de l'idée que la thérapie idéale pour les maladies monogéniques

serait de mettre au point une méthode qui peut corriger directement les mutations à l'origine de la maladie, mais comme l'édition du génome s'est développée parallèlement à l'amélioration continue de notre compréhension de la contribution génétique aux maladies non monogéniques, le principe de l'édition du génome est en cours de développement non seulement pour guérir les maladies monogéniques, mais aussi pour guérir les maladies plus courantes qui ont des origines multifactorielles. L'utilisation de l'édition du génome pour guérir les maladies monogéniques est conceptuellement simple (l'édition du génome peut être utilisée pour corriger les erreurs de typographie génomique sous-jacentes), mais la puissance de l'édition du génome est qu'elle fournit un mécanisme qui peut faire plus que simplement modifier les nucléotides simples. C'est une méthode qui peut apporter des changements génomiques plus sophistiqués et nuancés, qui peuvent être utilisés pour guérir des maladies plus courantes ou modifier leur évolution. La nature exacte de l'édition thérapeutique doit être guidée par une solide compréhension de l'interaction entre la génétique sous-jacente et la pathophysiologie spécifique de la maladie. En d'autres termes, une stratégie d'édition peut être appropriée pour une maladie, mais non applicable à une autre [125].

2. Définitions

2.1 . Les biotechnologies

Le terme biotechnologie fait référence à l'utilisation de systèmes vivants ou de l'ingénierie moléculaire pour créer et fabriquer des thérapies biologiques et des produits destinés aux soins des patients. Les principales catégories de produits comprennent les protéines à grosses molécules ; des peptides ; des anticorps monoclonaux ; thérapies cellulaires, tissulaires et génétiques ; les liposomes ; des polymères ; et des vaccins à ingénierie moléculaire.

Depuis plus de trente ans, l'industrie de la biotechnologie a fait des progrès extraordinaires tant en thérapeutique que dans les affaires. Celles-ci incluent le développement de vingt technologies innovantes conduisant à de nouveaux produits,

l'approbation de plus de 260 nouvelles thérapies humaines couvrant plus de 230 indications, la création de plus de quatre mille six cents sociétés de biotechnologie dans le monde entier, 1 à 5 et des ventes mondiales de plus de 175 \$ Milliards en 2013. Aux fins du présent article, nous avons classé les sociétés dans la catégorie «biotechnologie» sur la base des désignations utilisées par Ernst and Young dans son rapport annuel sur la biotechnologie [126].

2.2. Les thérapies géniques

2.2.1. Définition du terme « thérapie génique »

La thérapie génique humaine est définie comme le traitement d'un trouble ou d'une maladie par transfert de matériel génétique modifié dans des cellules humaines, souvent par transduction virale [127].

La capacité à effectuer des modifications locales dans le génome humain est l'objectif de la médecine depuis la connaissance de l'ADN en tant qu'unité de base de l'hérédité. Par thérapie génique, on entend la capacité d'amélioration génique au moyen de la correction de gènes modifiés (mutés) ou de modifications spécifiques à un site ayant pour cible un traitement thérapeutique. Plus loin, différentes stratégies sont décrites, qui sont souvent utilisées à cette fin.

Actuellement, la thérapie génique est un domaine qui prédomine dans les laboratoires de recherche et son application est encore expérimentale. La plupart des essais sont menés aux États-Unis, en Europe et en Australie. L'approche est large, avec un traitement potentiel des maladies causées par des mutations géniques récessives (fibrose kystique, hémophilie, dystrophie musculaire et anémie falciforme), des maladies génétiques acquises telles que le cancer et certaines infections virales telles que le SIDA. L'une des techniques les plus utilisées consiste à utiliser la technologie de l'ADN recombinant, dans laquelle le gène d'intérêt ou le gène sain est inséré dans un vecteur, qui peut être un plasmidien, une nanostructurée ou un virus ; ce dernier est le plus souvent utilisé en raison de son efficacité à envahir les cellules et à introduire son matériel génétique [128].

2.2.2. La thérapie génique somatique

La thérapie génique somatique consiste à introduire les modifications génétiques dont on espère qu'elles seront curatrices dans les cellules somatiques d'un organisme constitué, sans modifier les cellules du germe. Dans ces conditions, le changement génétique introduit ne sera pas héréditaire. En d'autres termes, les enfants d'un malade traité par thérapie génique somatique auront le même risque d'être porteur de la maladie que si leur géniteur n'avait pas été traité. Selon le type d'affection en cause, deux approches de thérapie génique somatique peuvent être envisagées. - La greffe de cellules génétiquement modifiées Cette méthode peut être définie comme une autogreffe de cellules génétiquement modifiées en dehors de l'organisme. Les cellules d'un organe atteint par une maladie génétique sont prélevées chez le malade, traitées en dehors de l'organisme par introduction d'un gène normal palliant la déficience de leur propre gène non fonctionnel, puis réintroduites chez le malade. Il n'y aura pas, dans ce cas, de rejet systématique du greffon puisqu'il est rigoureusement identique aux autres cellules du malade à l'exception de ce nouveau gène qu'il possède et dont on espère qu'il normalisera les fonctions de l'organe altéré par la maladie génétique. En revanche, une réaction immune contre la protéine codée par le transgène est possible. Pour qu'une telle démarche puisse être envisagée, il faut évidemment que la maladie génétique n'altère qu'un seul organe dont les cellules peuvent être prélevées et réintroduites. Il en va ainsi des cellules du sang, de la moelle osseuse, peut-être du foie, des vaisseaux de la peau et du muscle, comme cela sera détaillé dans les chapitres suivants.

L'administration in vivo d'un vecteur contenant le gène d'intérêt Chez d'autres malades, l'affection altère un organe dont il est difficile de prélever ou de réinjecter un grand nombre de cellules (par exemple le cerveau ou le poumon), ou encore s'exprime au niveau d'une grande diversité de cellules et d'organes des sujets atteints. Dans ces cas, il faut envisager d'apporter, sous une forme quelconque, le gène potentiellement curateur directement dans l'organisme. Il peut être difficile, alors, d'éviter que certains

de ces gènes ne s'intègrent dans quelques cellules du germe. Des maladies aussi fréquentes que la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne ou la maladie de Tay Sachs ne pourraient, probablement, être traitées par transfert de gènes que selon ce schéma.

2.2.3. La thérapie génique germinale

Il existe théoriquement deux moyens de pratiquer une thérapie génique germinale. La première consiste à introduire la modification dans toutes les cellules d'un embryon très précoce, voire dans l'unique cellule de l'œuf nouvellement fécondé. Dans ce cas, la modification se retrouvera dans toutes les cellules de l'organisme développé, le soma aussi bien que le germe. Chez l'animal, cette approche, dénommée transgénèse, est maintenant très couramment pratiquée ; elle permet d'obtenir des modèles animaux de maladies humaines, de créer des animaux produisant des substances d'intérêt biologique, ou est utilisée pour étudier le rôle ou le fonctionnement de certains gènes. La transgénèse consiste à ajouter un gène au patrimoine génétique d'un organisme, en l'insérant, soit au hasard dans les chromosomes, soit à sa place normale, en remplacement du gène dont l'altération est responsable de la maladie.

On parle, dans ce dernier cas, de recombinaison homologe, applicable à l'animal mais non, dans l'état actuel de nos connaissances, à l'homme, au moins dans le cadre d'une modification génétique de l'embryon entier. En revanche, la transgénèse avec intégration au hasard serait, pratiquement et théoriquement, possible chez l'homme.

Une deuxième forme de thérapie génique germinale consisterait, dans un organisme constitué, à intégrer un gène spécifiquement dans les cellules germinales. Il n'existe, jusqu'à présent, aucun moyen de parvenir à un tel résultat. Ainsi, la seule thérapie génique germinale qui pourrait être appliquée à l'homme est-elle la transgénèse par apport d'un nouveau gène dans l'embryon précoce humain ; il aboutirait à un organisme dont les cellules somatiques seraient génétiquement modifiées et qui transmettrait par ses cellules germinales cette modification à une partie de sa descendance[129].

2.3. Etude du génome

Le projet du génome humain a transformé la biologie grâce à son approche intégrée de la grande science consistant à déchiffrer une séquence de référence du génome humain ainsi que les séquences complètes d'organismes modèles clés. Le projet illustre la puissance, la nécessité et le succès d'importants efforts interdisciplinaires intégrés (ce qu'on appelle la «grande science») visant des objectifs majeurs complexes. Dans cet article, nous examinons en quoi cette entreprise ambitieuse a conduit à la mise au point de technologies et d'outils d'analyse innovants, et en quoi elle a réuni les compétences d'ingénieurs, d'informaticiens et de mathématiciens ainsi que de biologistes. Il a mis en place une approche ouverte du partage de données et des logiciels à source ouverte, rendant ainsi les données résultant du projet accessibles à tous. Les séquences génomiques de microbes, de plantes et d'animaux ont révolutionné de nombreux domaines scientifiques, notamment la microbiologie, la virologie, les maladies infectieuses et la biologie végétale. De plus, une connaissance approfondie de la variation des séquences humaines a commencé à modifier la pratique de la médecine. Le projet du génome humain a inspiré d'autres initiatives d'acquisition de données à grande échelle, telles que le projet international HapMap, 1000 génomes et l'Atlas du génome du cancer, ainsi que le projet récemment annoncé sur le cerveau humain et le projet émergent sur le protéome humain[130].

3. Modalités d'utilisation de la thérapie génique

2.1. Addition d'un gène

L'addition d'un gène consiste à insérer dans le noyau cellulaire ou directement dans le génome de la cellule hôte un nouveau gène, qu'on appelle transgène. Dans la plupart des cas, l'expression du transgène permet à la cellule de produire son propre « médicament ». Cette méthode ne fonctionne que si la maladie est due à une protéine non ou peu fonctionnelle.

Le transgène peut rester en dehors du génome : il se comporte alors comme un épisode, se réplique de façon indépendante, mais peut être perdu lors des divisions

cellulaires. Ou bien, il peut être inséré dans le génome par le vecteur. Il est alors important de pouvoir contrôler le site d'insertion(par exemple dans un « safe-harbor » c'est-à-dire, une région de l'ADN qui peut être modifiée sans crainte de provoquer des mutations) afin de ne pas modifier des gènes fonctionnels [131, 132].

L'intégration au sein de l'hétérochromatine ne permet généralement pas l'expression du transgène et n'a aucune conséquence sur le génome de l'hôte.

L'intégration au sein de l'euchromatine, entre les gènes est la situation idéale. Le transgène peut s'exprimer sans modification de l'expression du génome de l'hôte.

L'intégration au sein d'une région régulatrice de la transcription peut avoir plusieurs conséquences. Le transgène s'exprime dans la majorité des cas mais son expression peut être modifiée par les éléments régulateurs environnants. En parallèle, les éléments régulateurs présents dans la cassette génique peuvent modifier l'expression des gènes environnants voire empêcher l'expression d'un gène actif.

L'intégration au sein d'une région transcrite d'un gène (ici, gène X) permet l'expression du transgène mais peut bloquer l'expression du gène X ou provoquer la production d'une protéine mutée à partir de ce gène.

Les situations 3 et 4 sont les plus dangereuses car elles peuvent conduire à de graves mutations et à l'apparition de cellules tumorales. Il est donc crucial de pouvoir contrôler les sites d'insertion des transgènes par l'étude et la sélection des vecteurs.

2.2. Réparation des gènes

La réparation des gènes consiste à utiliser une séquence d'ADN ou d'ARN pour modifier le génome de la cellule hôte et corriger l'anomalie d'expression du gène à l'origine de la maladie.

Plusieurs techniques utilisant l'allèle entier sont à l'étude[131].

Remplacement de l'allèle muté par recombinaison homologue spontanée avec l'allèle normal. Dans ce cas, on injecte dans les cellules cibles des allèles sauvages sans autre molécule pour aider à la recombinaison homologue. Cependant, la fréquence de

recombinaison homologue spontanée est très faible (inférieure à $1/10^6$ cellules modifiées) (**Figure 18, A**) .

Remplacement des deux allèles par insertion d'une séquence d'ADN double brin sur le même locus pour permettre une régulation normale du transgène. On utilise alors des endonucléases endogènes, des nucléases en doigts de zinc (**Figure 18, B**) ou des enzymes synthétiques, spécifiques d'une région de l'ADN afin de cibler le locus, exciser les allèles endogènes et les remplacer par les allèles sauvages. La régulation du gène est donc conservée.

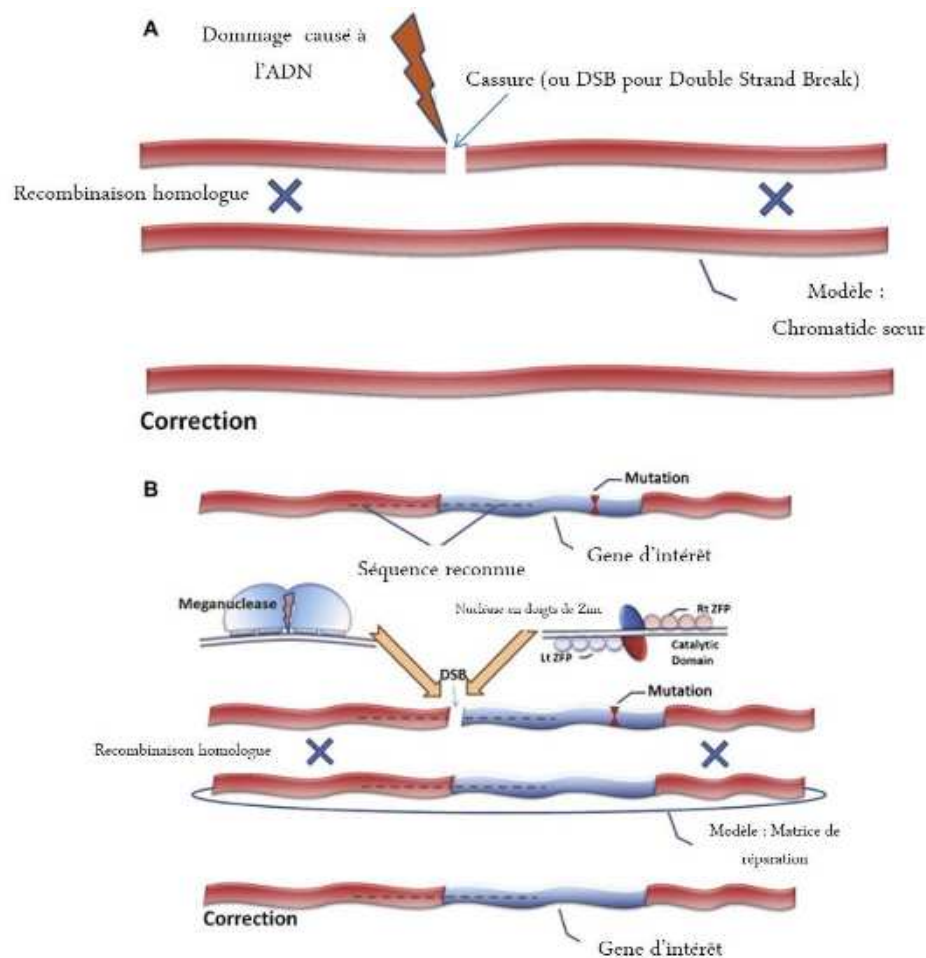


Figure 21 : Recombinaison homologue. A : spontanée, B : Intervention d'une nucléase en doigts de Zinc[130]

Il existe aussi des méthodes de remplacement d'un seul nucléotide par recombinaison homologue avec des oligonucléotides. Les oligonucléotides synthétiques ne diffèrent de la séquence génétique ciblée que par quelques bases azotées (une à cinq) afin de garantir la possibilité d'une recombinaison homologue. La modification du génome cible est alors réalisée par le système endogène de réparation de l'ADN [133].

D'autres systèmes de clivage spécifique de l'ADN/ARN sont à l'étude et pourront être utilisés à terme en thérapie génique comme les enzymes en doigts de zinc. Ces systèmes sont actuellement utilisés en ingénierie des génomes. On peut citer par exemple les « transcription activator-like effect nucleases » (TALEN) et les « clustered short palindromic repeats » (CRISPR).

Les TALEN sont des protéines chimériques contenant un domaine capable de se lier à l'ADN de manière spécifique (appelé TALE) et un domaine catalytique non spécifique (une nucléase). Le domaine se liant à l'ADN est dérivé de protéines appelées TALE pour Transcription Activator-Like Effectors présentes chez les bactéries du genre *Xanthomonas*. Ces bactéries sont des parasites végétaux ; les TALE leur permettent d'induire l'expression de certains gènes chez leur hôte. Le domaine se liant à l'ADN des TALE est composé de 13 à 28 unités de répétition de 34 acides aminés chacune. Ces unités de répétition ne se différencient que par deux résidus cruciaux en position 12 et 13 (appelés repeat variable di-residue ou RVD) qui déterminent le nucléotide auquel l'unité se lie. Il est cependant nécessaire que le premier nucléotide reconnu soit une thymine (appelée T_0) pour permettre l'activité des TALE.

La(**Figure 19**) montre le code de correspondance entre les résidus et les nucléotides.

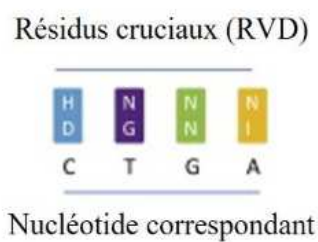


Figure 22 : Correspondance RVD /nucléotide

[134]

Légende

H : Histidine

G : Glycine

D : Acide aspartique

I : Isoleucine

N : Asparagine

Le site catalytique est issu de la nucléase FokI isolée chez la bactérie *Flavobacter iumokeanokoites*. Cette nucléase fonctionnant en dimère afin de pouvoir créer une cassure sur les deux brins de l'ADN, les TALEN vont toujours par paire et reconnaissent deux séquences d'ADN distantes de 14 à 30 nucléotides (séquence « espace »).

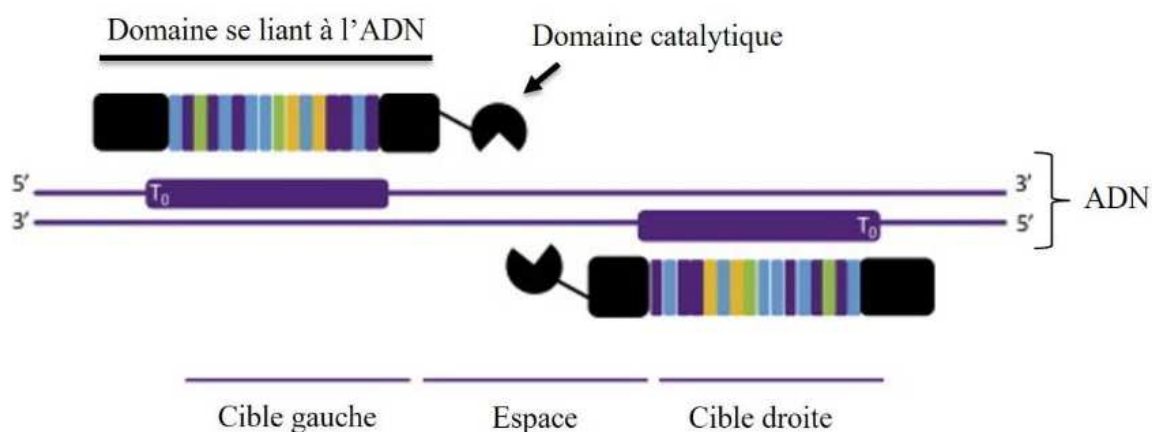


Figure 23 : Structure et mise en place des TALEN sur l'ADN [133]

La (**Figure 20**) schématise la structure des TALEN.

Il semblerait que les TALEN soient plus spécifiques que les enzymes en doigts de zinc : leur code de liaison à l'ADN est simple et le nombre des unités de répétition peut être augmenté afin de garantir la spécificité du site de clivage [135, 136].

Les **CRISPR** sont des séquences d'ADN non codantes. Elles appartiennent au système de défense immunitaire des bactéries et des archées. Lors d'une infection par un virus ou un bactériophage, il y a insertion d'une séquence d'ADN étrangère au génome de la bactérie ou de l'archée ce qui active les **CRISPR**. Le système **CRISPR** fonctionne en trois phases [137] :

Premièrement, il faut qu'il y ait insertion de l'ADN étranger au sein de la séquence des **CRISPR**.

Cette insertion déclenche la transcription des **CRISPR** en ARN (appelés crARN) par des protéines associées aux **CRISPR** ou Cas.

D'autres protéines Cas prennent en charge les crARN et forment un complexe capable de dégrader l'ADN étranger.

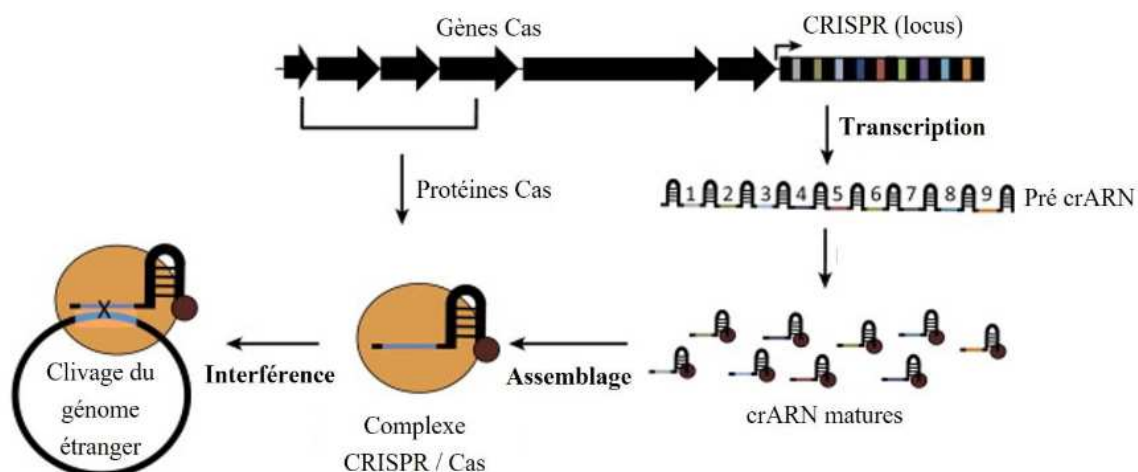


Figure 24 : Fonctionnement schématique du système CRISPR
 La (Figure 5) montre le fonctionnement schématique du système CRISPR.

[138]

Il est donc possible de modifier ces systèmes pour diriger l'action de dégradation vers le site de la mutation responsable de la maladie [139].

2.3. Modification de l'expression des gènes

Il est aussi possible de modifier l'expression des gènes en les empêchant de s'exprimer ou en forçant leur expression.

2.3.1 Extinction génique

2.3.1.1. Interférence de l'ARN

L'interférence de l'ARN est un mécanisme de régulation de l'expression génique présent chez de nombreux eucaryotes. L'interférence de l'ARN provoque la dégradation d'un ARNm cible par une enzyme dirigée par un ARN non codant, complémentaire de l'ARNm cible. Ce mécanisme a été découvert en 1998 par Fire et son équipe [140]. Cette équipe a mis en évidence le potentiel des ARN dans l'extinction génique en injectant des ARN double brin chez des nématodes (*Caenorhabditis elegans*).

On a découvert en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* le premier microARN appelé l'ARN lin-4 [141]. Ces microARN interviennent dans différents processus cellulaires comme la mitose, l'apoptose et le développement des différents tissus (cerveau, cœur, ...) ainsi que dans le mécanisme d'interférence de l'ARN. On en dénombre plus de 500 chez l'Homme et les chercheurs suspectent qu'il en existe plus d'un millier [142].

Les gènes des microARN appartiennent à la partie non codante du génome. Un premier pri-microARN est transcrit à partir du gène microARN par l'ARN polymérase II (Pol II). Il est ensuite clivé dans le noyau en pré-microARN par un complexe enzymatique (Drosha et DGCR8) puis exporté dans le cytoplasme via le transporteur Exp5. Il est alors à nouveau clivé par une enzyme spécifique appelée « Dicer » (complexée avec la protéine TRBP qui se lie au pré-microARN) pour devenir le microARN définitif (20 à 25 nucléotides).

La (Figure 22) illustre la synthèse des microARN.

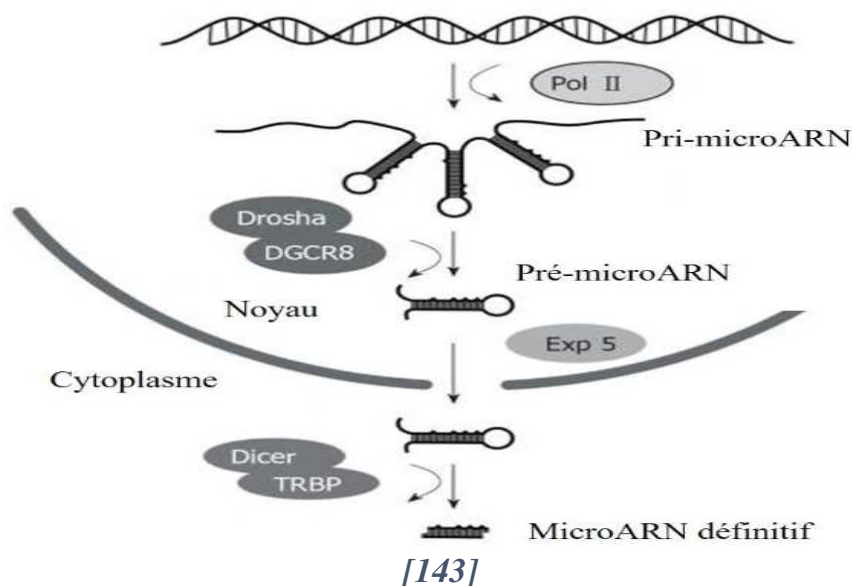


Figure 25 :Schéma de la synthèse des microARN

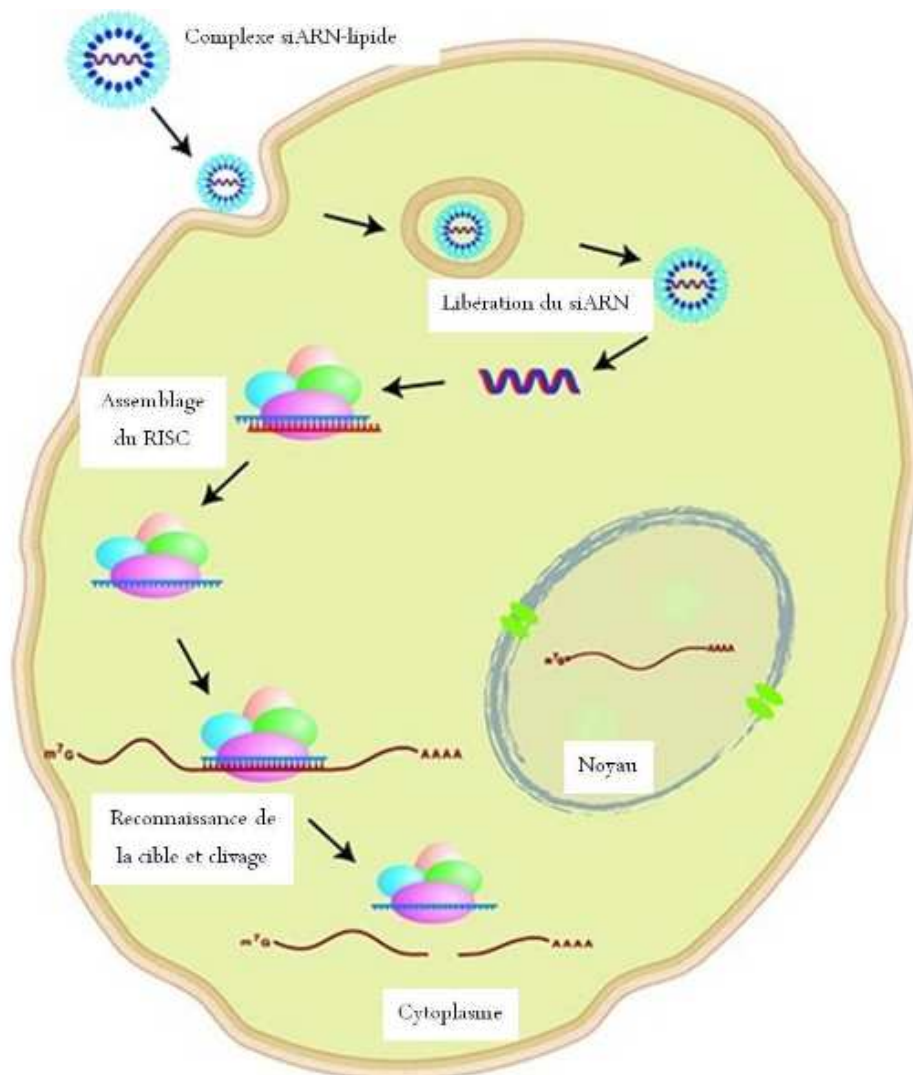
Les microARN peuvent interagir avec différents ARNm : une complémentarité parfaite conduit au clivage de l'ARNm (via la formation d'un RISC ou complexe d'extinction induit par l'ARN), une complémentarité partielle (2 à 8 nucléotides) conduit à une absence de traduction sans dégradation complète de l'ARNm.

Dans un objectif de modification de l'expression des gènes, deux types d'ARN régulateurs ont été créés :

les siARN pour « short interfering ARN » qui sont des ARN double brin artificiels qui ne peuvent pas être transcrits à partir d'ADN. Ils correspondent à un microARN définitif. La (**Figure 23**) montre le fonctionnement des siARN.

les short-hairspin ARN (en épingle à cheveux) transcrits à partir d'un plasmide ou par un virus recombinant. Ils correspondent à un pré-microARN.

Les siARN et les shARN sont parfaitement complémentaires des ARNm cibles et provoquent donc toujours la dégradation de leur cible [144].



*Figure 26 : Mécanisme d'action des siARN
[145]*

Les micro ARN sont utilisés dans la thérapie génique anti-cancéreuse principalement, mais aussi comme immunosuppresseurs.

Brown et son équipe ont démontré qu'il était possible d'assurer l'expression d'un transgène à long terme en détournant le système des microARN. A cette fin, ils ont inséré une séquence complémentaire d'un microARN endogène appelé miR-142-3p , spécifique des cellules hématopoïétiques, dans une cassette génique, transportée

par un lentivirus. Ils ont remarqué que le transgène ainsi créé s'exprimait significativement plus longtemps [146].

La (Figure 24) schématise l'expérience réalisée par Brown et son équipe.

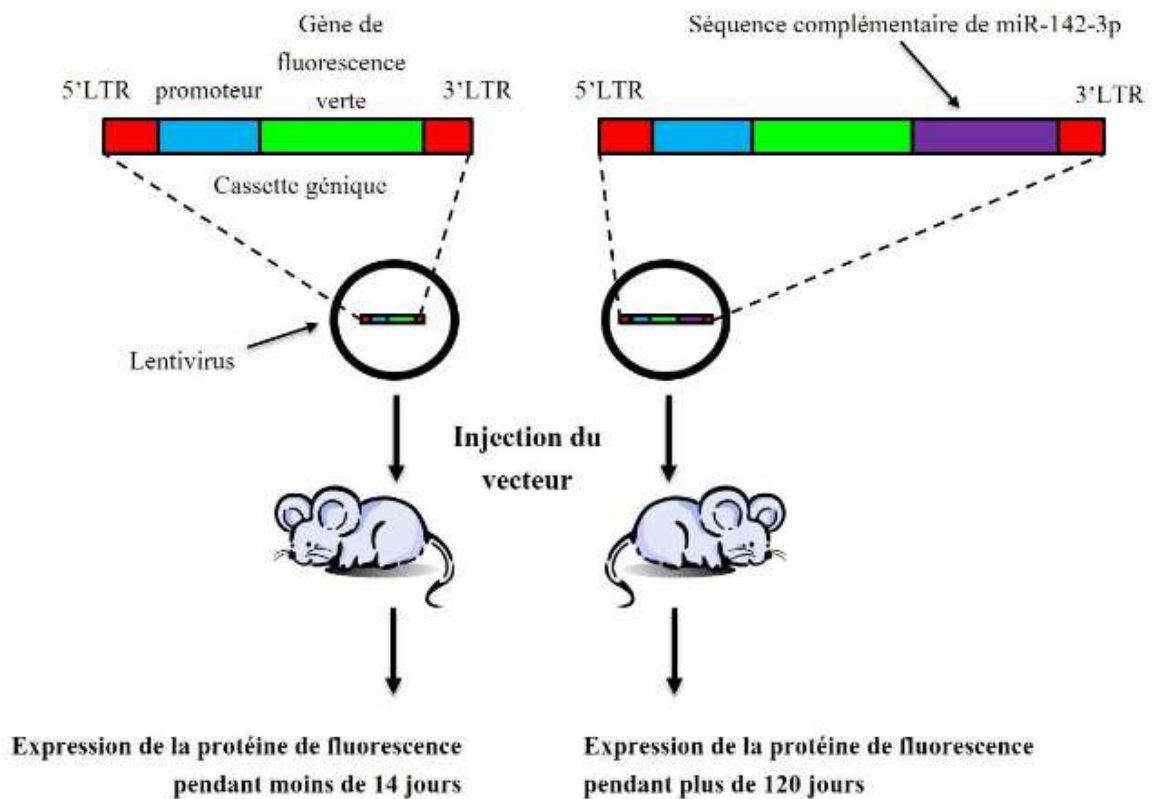


Figure 27 : Schématisation de l'expérience menée par Brown et son équipe [145]

La différence de durée d'expression est supposée être due à la clairance immunitaire. En effet, lors de l'administration d'un vecteur, une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur et le produit du transgène se met en place et provoque l'extinction de l'expression du transgène. Une des origines de cette réponse immunitaire est l'infection des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par le vecteur malgré la présence de promoteurs tissu-spécifiques dans la cassette génique. Or, dans cette expérience, une séquence complémentaire du miR-142-3p a été insérée dans la cassette

génique : de ce fait, ils ont supposé que la présence de cette séquence provoquait la dégradation du transgène dans les cellules hématopoïétiques dont font partie les CPA. Ainsi, le produit du transgène peut échapper à la réponse immunitaire. Brown et son équipe ont reproduit l'expérience et ont obtenu une expression à long terme du facteur IX chez des souris atteintes d'hémophilie B[146].

2.3.1.2. ARN anti-sens

Via un oligodésoxynucléotide qui se fixe sur une partie accessible d'un ARNm par complémentarité, il est en théorie possible d'empêcher la traduction de cet ARNm soit par blocage mécanique des ribosomes soit par recrutement d'une RNase[147]. Cette méthode est cependant peu spécifique et n'a pas un taux de réussite très élevé car trop hasardeuse.

2.3.1.3. Ribosomes et ADNzymes (ou désoxyribozymes)

Ce sont des acides nucléiques capables de cliver de façon spécifique de l'ARN. Ils se lient par complémentarité à un ARNm et le clivent en un site spécifique, empêchant ainsi la traduction. Il est possible de les encoder et de les transcrire à partir d'ADN [148].

2.3.1.4. Autres molécules régulatrices

De nouveaux outils pour moduler l'expression génique ont été créés, la plupart à base d'ARN comme les « ARN switches ». Ce sont des molécules d'ARN formées d'un domaine sensitif, capable de reconnaître certains signaux cellulaires (présence de certaines molécules, de certaines séquences génétiques voire d'une modification d'un paramètre physique comme la température ou le pH intracellulaire) et d'un domaine acteur, capable de moduler l'expression génique[144].

Il existe aussi un autre domaine de recherche pour les outils de modulation de l'expression génique : les molécules d'ADN formées par des liaisons de type Hoogsteen. La plupart des liaisons entre les bases azotées sont des liaisons hydrogènes de type Watson-Crick (**Figure 25, A**). Or, il existe un autre type de liaisons hydrogènes appelées liaisons de type Hoogsteen(**Figure 25, B**). Ces liaisons

permettent de former différentes sortes de structures tridimensionnelles de l'ADN, autres que la double hélice.

Il a été prouvé que les G quadruplexes (structures formées par quatre brins d'ADN au sein des régions riches en guanine, capables de se lier par des liaisons de type Hoogsteen à d'autres molécules d'ADN) interviennent dans la régulation de certains oncogènes[149]. Les triplexes (une double hélice d'ADN liée à un troisième brin d'ADN ou d'ARN par des liaisons de type Hoogsteen) sont aussi impliqués dans certains mécanismes endogènes d'extinction génique [150].

Suite à ces études, des molécules utilisant les liaisons de type Hoogsteen ont été développées comme les « polypurine reverse Hoogsteenhairpins ». Ce sont des molécules d'ADN formées par deux chaînes de purines antiparallèles reliées par une boucle de cinq thymidines. Les liaisons à l'intérieur des chaînes sont des liaisons de type Hoogsteen inversées. Ces molécules sont capables d'interférer avec les gènes et d'en modifier l'expression par liaison avec le gène cible ou l'ARNm, ce qui diminue l'expression du gène cible [151].

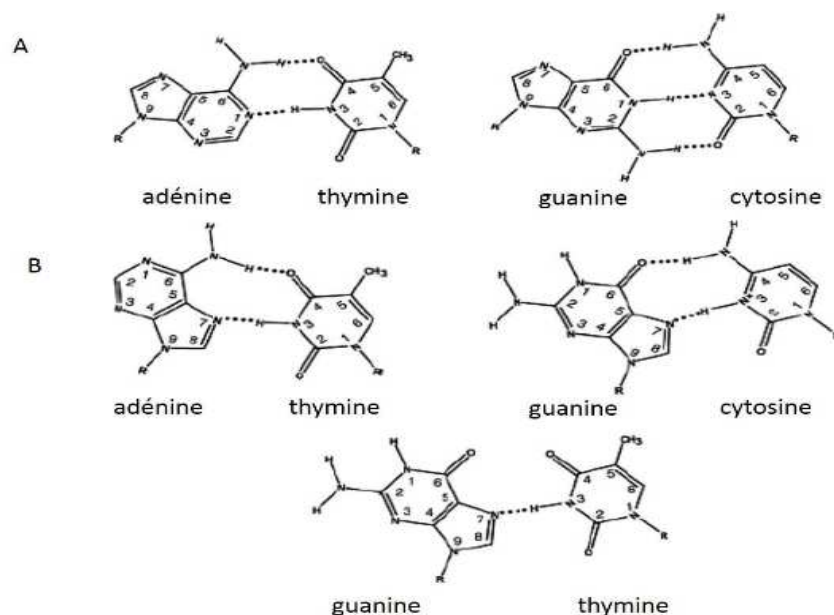


Figure 28 :A. Liaisons Watson-Crick, B. Liaisons Hoogsteen[149]

2.3.2 Expression forcée

L'expression forcée est le fait de provoquer l'expression de certains gènes d'un individu en insérant des promoteurs. On prendra ici l'exemple des thalassémies β .

Les thalassémies β sont des anémies héréditaires dues à une production réduite ou absente de chaînes β -globines qui composent l'hémoglobine (formule : $\alpha_2\beta_2$). De ce fait, les chaînes α -globines sont en surnombre et ne peuvent pas toutes se lier à des chaînes β ; elles précipitent sous forme d'homotétramères α_4 et empêchent la maturation des précurseurs des hématies, ce qui conduit à leur apoptose et donc à une anémie.

Le phénotype des malades dépend de leur génotype (homozygotes ou hétérozygotes pour une mutation du gène codant pour la chaîne β) mais aussi de leur capacité à produire des chaînes γ -globines, présentes lors de la vie fœtale. En effet, les chaînes γ sont capables de se lier aux chaînes α libres et de former l'hémoglobine fœtale (formule : $\alpha_2\gamma_2$), et ainsi de diminuer la gravité des symptômes de la maladie. Dans le traitement des thalassémies β par thérapie génique, une des pistes poursuivies est l'insertion d'une cassette génique comportant le gène de la γ -globine ainsi que son promoteur spécifique dans le génome des personnes malades. Cela provoquerait la production de cette globine par les cellules transduites et permettrait de réduire les symptômes de la maladie. Les essais cliniques in vitro sont prometteurs [152].

2.3.3 Autres modifications

Nous verrons dans la deuxième partie de cette thèse, dans le chapitre concernant la myodystrophie de Duchenne, qu'il est possible de provoquer un « saut d'exon » lors de l'épissage des ARN pré-messagers afin de modifier la protéine traduite à partir de cet ARNm et de réduire les symptômes de la maladie [153].

On remarque que, pour chaque maladie, les techniques développées précédemment sont adaptées afin de traiter la maladie avec la meilleure efficacité. Ainsi, la recherche sur ces maladies conduit régulièrement à la création de nouvelles techniques de thérapie génique.

4. Modalités d'administration de la thérapie génique

3.1. In vivo

L'administration in vivo consiste à injecter le vecteur par voies intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire directement chez l'hôte. Le principal problème est alors le contrôle de l'adressage de la séquence d'ADN d'intérêt uniquement dans les cellules cibles. Cette voie permettrait néanmoins l'utilisation de la thérapie génique à grande échelle et à moindre coût. Les études sur les vecteurs cherchent donc à les rendre utilisables et efficaces en thérapie in vivo.

On peut également injecter le vecteur directement dans le tissu cible. On appelle cette administration in situ. Cependant, le taux de transfection reste faible car le vecteur diffuse peu, ce qui est le plus souvent incompatible avec une guérison complète, sauf dans le cas de tumeur localisée (cf. chapitre sur la thérapie génique anticancéreuse) [154].

3.2. Ciblage de l'expression du transgène

Lors d'administrations in vivo, il est nécessaire de faire pénétrer le gène d'intérêt uniquement dans les cellules cibles et donc de pouvoir cibler l'utilisation de la thérapie génique. Le ciblage peut être réalisé à plusieurs niveaux :

Au niveau de la séquence d'ADN : Il est possible d'associer un promoteur tissu-spécifique au transgène. Malheureusement, peu de promoteurs spécifiques d'un seul tissu sont connus et l'expression qui suit l'utilisation d'un tel vecteur est souvent limitée en quantité, parfois trop faible pour avoir un effet thérapeutique.

Au niveau des vecteurs : Certains vecteurs, comme les virus, ont un tropisme naturel mais il est souvent très large. La plupart des vecteurs sont modifiables afin de leur faire porter des protéines de surface ciblant spécifiquement un tissu (ou pseudotypage, cf. ultérieurement).

Il est aussi possible de moduler **à distance** l'expression d'un transgène en utilisant par exemple des promoteurs réagissant à la présence ou à l'absence d'une molécule. On prendra comme exemple les systèmes « Tet Off » / « Tet On ».

Les systèmes « Tet Off » / « Tet On » sont dérivés de l'opéron bactérien de résistance à la tétracycline. Des trans-activateurs (rTA) sont produits de façon constitutive à partir de la fusion de la protéine tet-répresseur (tetR) et d'une protéine virale (VP16). Dans le système « Tet Off » (Figure 10, a), en absence de doxycycline (Dox), les trans-activateurs se lient à la séquence tet-opératrice (TetO) et provoquent l'activation du promoteur du cytomégalovirus (CMV) ainsi que l'expression du transgène. La doxycycline se lie aux trans-activateurs, les empêchant ainsi d'activer TetO. Le système « Tet On » fonctionne à l'inverse (Figure 10, b) [155].

Le système « Tet Off » (expression en absence d'antibiotiques) est particulièrement intéressant pour la thérapie génique alors qu'en transgénèse animale, c'est surtout le système « Tet On » (expression en présence d'antibiotiques) qui est utilisé.

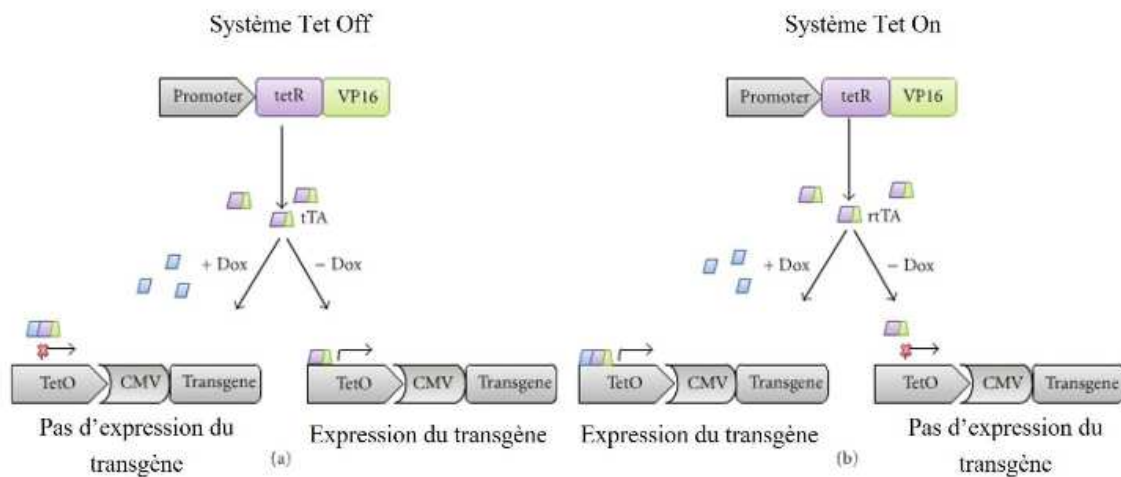


Figure 29 : Mécanismes des systèmes « Tet Off » / « Tet On » [154]

On ne développera pas plus ici les techniques de ciblage car elles sont spécifiques à chaque couple maladie/vecteur.

3.3 . Ex vivo

L'administration ex vivo se déroule en trois étapes :

Prélèvement des cellules de l'hôte (selon la maladie, des cellules sanguines ou de leurs précurseurs, qui seront réinjectées dans la circulation ou des fibroblastes qui seront greffés comme un néo-organe),

Transfection en culture in vitro des cellules prélevées,

Réinjection ou greffe chez le sujet des cellules transfectées.

Cette administration permet de cibler la thérapie génique uniquement vers les cellules ou le tissu à corriger et d'éviter ainsi des foyers ectopiques d'expression du transgène. Elle empêche aussi toute réaction immunitaire au vecteur puisqu'il n'est pas en contact direct avec l'organisme [154].

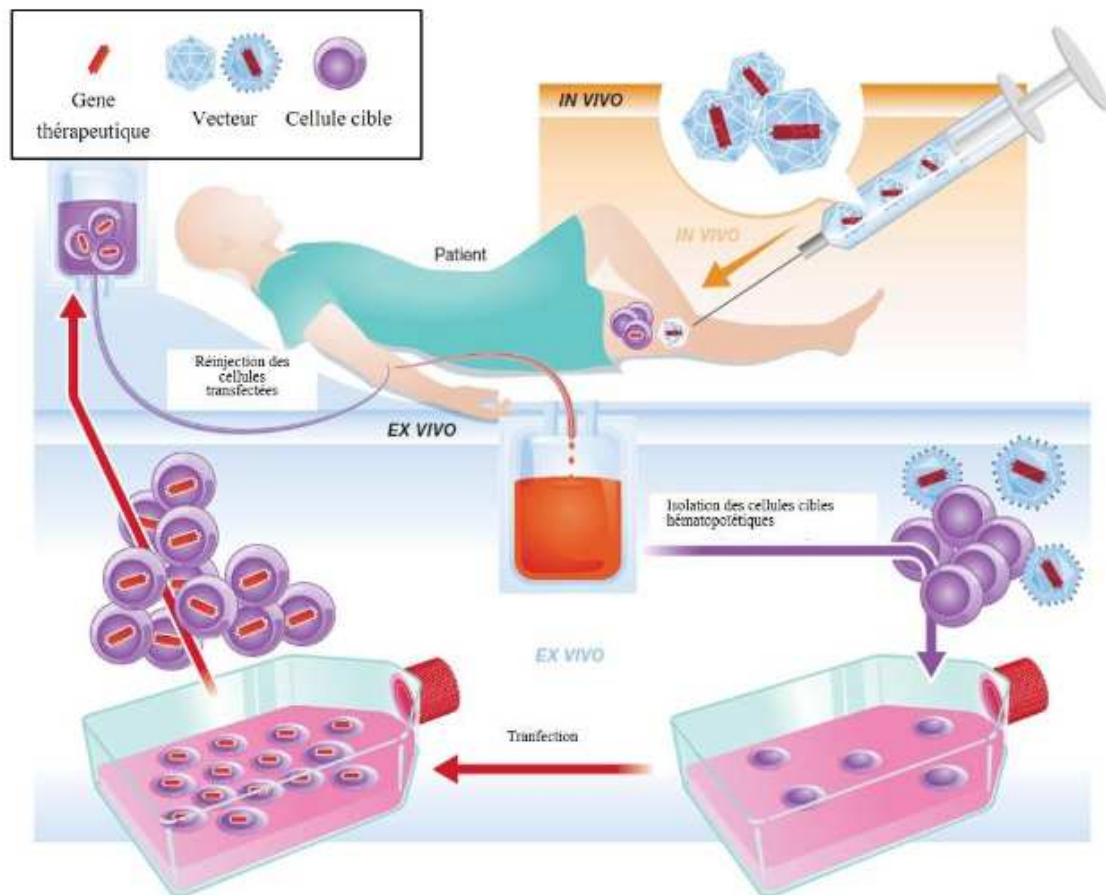


Figure 30 : Concept de thérapie génique in vivo et ex vivo [156]

5. Les vecteurs

Un vecteur est une structure permettant le transport, la pénétration du transgène dans les cellules cibles, son expression et son action thérapeutique.

Le vecteur idéal a plusieurs propriétés [132, 157] :

- ▲ Culture/production facile et de faible coût,
- ▲ Faible immunogénicité,
- ▲ Non cytotoxique ou pathogène,
- ▲ Possibilité d'insérer une séquence d'ADN relativement longue,
- ▲ Protection de la séquence insérée contre les nucléases,
- ▲ Capacité d'infection des cellules quiescentes comme en division,
- ▲ Ciblage des cellules à transfecter possible,
- ▲ Ciblage du site d'insertion ou insertion en un site non mutagène,

Expression à long terme du transgène chez l'hôte.

A l'heure actuelle, on peut classer les vecteurs en deux types : les vecteurs viraux, les vecteurs non viraux.

4.1. Les vecteurs viraux

Les virus sont naturellement capables de pénétrer dans les cellules et d'y injecter leur propre génome afin de se répliquer. En réussissant à supprimer les gènes responsables de la pathogénicité des virus sans modifier leurs capacités de pénétration, ces derniers sont devenus des vecteurs de choix pour le transport et la livraison des gènes en thérapie génique. Le principal risque de l'utilisation de virus en tant que vecteurs est leur pathogénicité résiduelle pour l'hôte, malgré les délétions des gènes à effet pathogène, et le risque qu'ils le redeviennent par mutation. Enfin, le principal défaut des virus est leur immunogénicité[132].

De nombreux virus sont utilisés en thérapie génique (Adénovirus, Lentivirus, Adeno-Associated Virus ou AAV, Herpesvirus, ...) et chaque famille de virus a ses avantages et ses inconvénients. Nous allons prendre ici quelques exemples de virus utilisés en thérapie génique.

4.1.1. Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus nus à ADN double brin. Leurs caractéristiques sont :

Taille des virions entre 80 et 120nm de diamètre,

Capside icosaédrique,

Génome linéaire et long de 26 à 44 kilobases (kb).

Il existe plus de cent sérotypes découverts à ce jour dont 51 infectant l'Homme. Les adénovirus figurent parmi les vecteurs les plus utilisés en thérapie génique et le sérotype 5 (HAd5) est le plus étudié [158].

Les adénovirus s'attachent aux cellules via un récepteur appelé CAR (pour Coxsackievirus and Adenovirus Receptor). La protéine virale VI permet l'échappement de l'endosome. Les dynéines cytoplasmiques permettent le transport de la capside le long des microtubules jusqu'aux pores nucléaires où la capside est désassemblée via l'interaction avec différentes protéines pour libérer le matériel génétique dans le noyau sous forme d'épisome (**Figure 28**) [159].

Les adénovirus sont capables d'infecter les cellules en division comme les cellules quiescentes, mais ils n'intègrent pas leur ADN dans le génome de la cellule cible. Cela permet d'éviter les mutations par intégration, mais empêche une expression à long terme du transgène pour lequel on observe un pic d'expression en 1 à 7 jours puis un rapide déclin en 2 à 4 semaines post-infection.

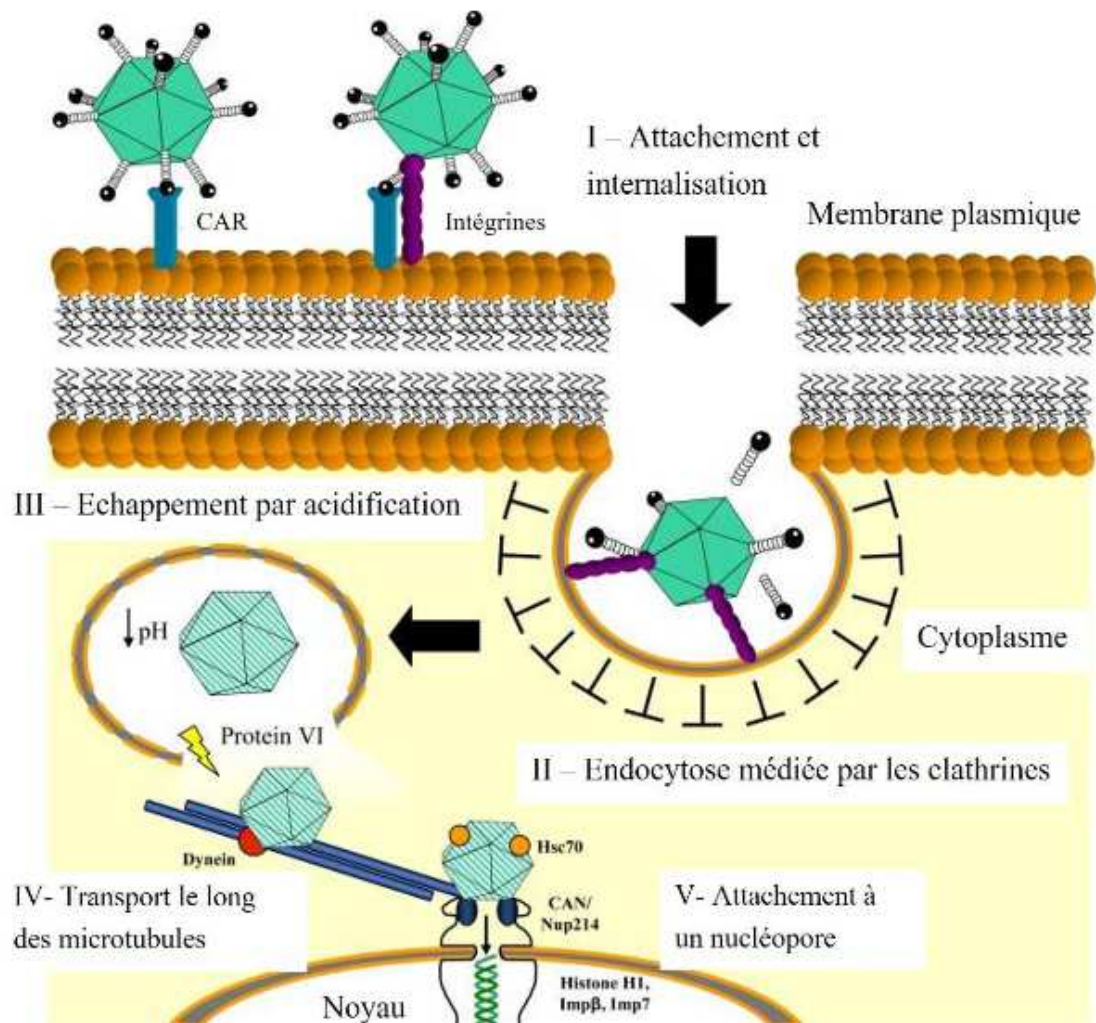


Figure 31 : Mode de pénétration de l'adénovirus HAd5[158]

La première génération de vecteurs a montré une capacité à transfecter de nombreux tissus (muscles, cerveau, pancréas, rein, ...) lors d'une injection directe du vecteur dans le tissu cible alors que seulement le foie et la rate étaient transfectés lors d'injection intraveineuse. Cela a été imputé à la réaction immunitaire mise en place au contact du vecteur. Les vecteurs de première génération étaient capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 8kb [154].

Des adénovirus vides ou « gutless » ont été créés afin de résoudre ce problème. Ils ne comportent plus d'ADN viral sauf les quelques séquences strictement nécessaires à la réplication du génome. Ces adénovirus sont produits en présence de cellules transcomplémentantes ou cellules « helper » qui leur procurent les protéines virales nécessaires à la construction des virions [160]. Ces virus sont capables de transporter des transgènes de plus grande taille (jusqu'à 38kb) et l'expression du transgène se fait à plus longue échéance (une étude a montré une expression pendant plus de 2 ans dans le foie de babouins) [161].

De nombreuses études sont réalisées afin de moduler le tropisme des adénovirus via l'identification des récepteurs cellulaires et viraux impliqués dans la pénétration cellulaire et dans la réponse immunitaire. En particulier, l'utilisation des adénovirus en thérapie génique anticancéreuse est compliquée par le fait que la plupart des cellules cancéreuses n'expriment pas le récepteur CAR [158]. Ces recherches sont donc essentielles pour pouvoir utiliser les adénovirus comme vecteurs dans le traitement des maladies acquises.

4.1.2. Les adeno-associated virus

Les Adeno-Associated Virus (ou AAV) sont des virus incapables de se répliquer sans un virus « helper » tel que les adénovirus, les herpesvirus, ... Ce sont de petits virus (18-26 nm) nus à ADN simple brin.

A l'état naturel, ils sont capables de s'intégrer dans le génome humain, préférentiellement dans un site spécifique sur le chromosome 19 grâce à des protéines

virales codées par leur gène REP. Le taux d'intégration spontanée est faible et quasiment nul quand le gène REP est supprimé. Dans ce cas, l'intégration perd aussi sa spécificité de site [161, 162]. Leur matériel se comporte la plupart du temps comme un épisode et reste en dehors du génome de la cellule infectée. Les vecteurs créés à partir d'AAV sont capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 4,8kb [154].

Il a été démontré que l'expression du transgène était longue (jusqu'à 9 ans chez des chiens). Il existe de nombreux sérotypes peu toxiques pour l'organisme et chaque sérotype cible préférentiellement différents organes (par exemple, le sérotype 2 infecte préférentiellement les cellules musculaires et les neurones) [160]. Ils sont donc tout indiqués pour servir de vecteurs en thérapie génique des maladies affectant l'appareil musculaire ou le système nerveux.

Le principal inconvénient est qu'il faut injecter une grande quantité de virus afin d'obtenir une réponse thérapeutique significative et que cela provoque chez l'hôte une forte réaction immunitaire [163], d'autant plus précoce que ces virus sont très répandus dans la population humaine ou animale. Une étude réalisée en 2010 par Sylvie BOUTIN et son équipe révèle que 60% de la population humaine possède des anticorps anti-AAV1 et anti-AAV2 [164]. De nombreuses études sont en cours afin de trouver les sérotypes qui permettront une meilleure efficacité de transfection (en quantité) tout en limitant leur immunogénicité[165].

4.1.3. Les Retroviridae

Les Retroviridae sont une famille de virus enveloppés à ARN simple brin. Ils possèdent tous une reverse transcriptase qui permet de transcrire leur matériel génétique en ADN, une intégrase qui permet l'intégration du matériel génétique viral au génome de la cellule infectée et trois gènes principaux : pol, gag et env qui codent respectivement pour la reverse transcriptase et l'intégrase, les protéines de la capsidie et les protéines de l'enveloppe. Ils mesurent 80 à 130 nm de diamètre et leur génome fait de 8 à 11 kb. Les vecteurs fabriqués à partir de virus de la famille des retroviridae

ne possèdent plus les gènes nécessaires à la réplication. Les vecteurs sont créés en présence de cellules possédant ces gènes (cellules transcomplémentantes), qui leur fournissent ainsi les protéines virales nécessaires à la construction des virions. Cependant, le signal d'encapsidation et les régions LTR (Long Terminal Repeat) qui bordent le génome de ces virus doivent être maintenus car elles interviennent dans plusieurs étapes importantes comme l'intégration et la régulation de la transcription du génome virale. En les conservant, on assure ainsi la bonne intégration et l'expression du transgène transporté par le vecteur [160].

On peut classer les rétrovirus en deux catégories : les simples (alpharétrovirus, bêtarétrovirus, gammarétrovirus et épsilonorétrovirus) et les complexes (deltarétrovirus, lentivirus et spumavirus) selon la diversité des protéines codées par le génome viral. En effet, les rétrovirus complexes sont capables de pénétrer dans le noyau cellulaire via un transport actif alors que les rétrovirus simples profitent de la mitose pour pénétrer le noyau [161].

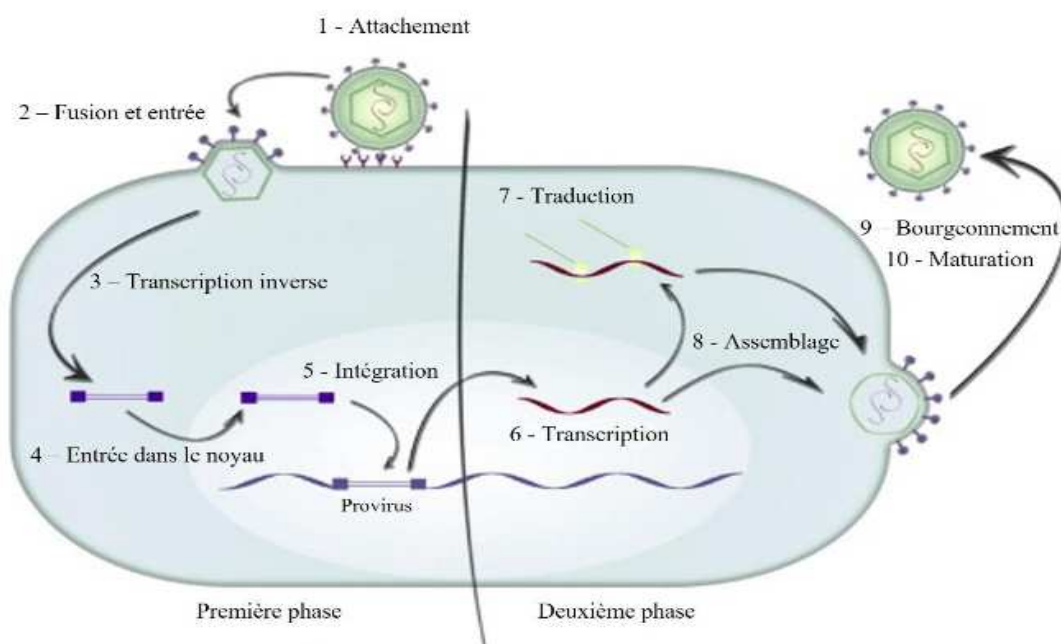


Figure 32 : cycle de vie des rétrovirus [166]

Dans le cas des virus enveloppés, et particulièrement dans le cas des retroviridae, on peut modifier le tropisme du vecteur viral en le pseudotypant.

Le pseudotypage est une technique qui consiste à modifier les glycoprotéines de surface des vecteurs viraux afin de modifier leur tropisme tissulaire. Cette technique est dérivée de la modification des enveloppes des virus lorsque deux types de virus (ou plus) infectent la même cellule. Lors du bourgeonnement, les virions des deux types se retrouvent porteurs de ses propres glycoprotéines ainsi que de celles de l'autre type de virus. On peut donc attribuer à un vecteur viral enveloppé la glycoprotéine que l'on souhaite pour pouvoir maîtriser son tropisme. A ce jour, les glycoprotéines les plus utilisées en pseudotypage sont les glycoprotéines du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G). Ce virus possède un tropisme très large (presque tous les types cellulaires peuvent être infectés par un virus de la stomatite vésiculeuse) et une enveloppe très stable qui permet l'utilisation de l'ultracentrifugation pour concentrer le vecteur viral. Il existe d'autres types de pseudotypage qui ne seront pas développés ici[167].

4.1.3.1. Les rétrovirus simples

Les rétrovirus simples ont été très utilisés au début des essais cliniques en thérapie génique comme vecteur car ils permettent une intégration stable du transgène dans le génome de l'hôte. Ils ne peuvent cependant infecter que des cellules en division. Cela en fait des vecteurs tout indiqués dans les thérapies géniques *ex vivo*. Plusieurs virus ont été utilisés avec succès comme vecteur en thérapie génique comme le virus de la leucémie murine de Moloney. Les vecteurs créés à partir de rétrovirus ont une capacité de 8kb [154]. Leurs inconvénients sont cependant majeurs : ils sont immunogènes (comme la majorité des vecteurs viraux) et peuvent provoquer le déclenchement de cancers par activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène répresseur de tumeurs lors de l'insertion du transgène dans le génome cellulaire. Cela a été le cas lors de l'essai clinique conduit sur des enfants atteints du syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié à l'X (SCID X) en 2000. Onze enfants ont

reçu par thérapie génique ex vivo le gène codant pour la chaîne γ du récepteur aux interleukines et ont été guéris du SCID X. Malheureusement, plusieurs cas de leucémies ont été rapportés dans les trois ans qui ont suivi l'essai clinique. Le déclenchement de la leucémie a été attribué à l'insertion du transgène au sein d'un proto-oncogène[168]. Les rétrovirus simples sont donc relégués au second plan jusqu'à ce qu'on sache maîtriser leur lieu d'insertion dans le génome hôte.

4.1.3.2. Les lentivirus

Au sein des *retroviridae*, les lentivirus (rétrovirus complexes) sont particulièrement étudiés en ce moment comme vecteurs en thérapie génique.

On utilise en thérapie génique des « self-inactivating » lentivirus (ou SIN lentivirus) dont le génome a été modifié afin de les rendre incapables de se répliquer.

Les lentivirus ont la capacité d'infecter des cellules quiescentes grâce à des protéines virales capables de faire pénétrer leur matériel génétique dans le noyau des cellules cibles via les pores nucléaires [160] ce qui en fait des vecteurs de choix pour toutes les maladies impliquant des cellules hautement différenciées et qui se divisent peu, comme les neurones. Et comme tous les rétrovirus, ils sont capables d'insérer leur génome dans celui de la cellule hôte ce qui permet une expression à long terme du transgène. Cependant, cette insertion dans le génome des cellules hôtes a déjà eu pour résultat de provoquer des mutations chez les cellules cibles. Néanmoins, les lentivirus seraient moins susceptibles de provoquer ces mutations par insertion [168]. En effet, ils insèrent naturellement leur matériel génétique près des sites de transcription actifs alors que les autres rétrovirus ont plutôt tendance à s'intégrer près des promoteurs, ce qui augmente le risque d'oncogénèse[160]. Il est aussi possible d'utiliser des lentivirus qui ne peuvent pas intégrer leur matériel génétique : ce sont les « Non Integrating Lenti Viruses » (NILVs). Dans ce cas-là, le transgène reste sous forme d'épisome dans le noyau cellulaire et l'expression à long terme du transgène est liée à l'état de quiescence des cellules infectées [161]. Tout comme les rétrovirus simples, les vecteurs construits à partir de lentivirus ont une capacité de 8kb [154].

Malheureusement, les lentivirus induisent une forte réponse immunitaire de l'hôte à l'encontre du transgène ce qui diminue la durée de vie des cellules corrigées et donc l'effet thérapeutique. Une des pistes d'étude serait l'utilisation de microRNA pour induire une immunotolérance en empêchant l'expression du transgène dans les cellules présentatrices d'antigènes [169].

4.2 . Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non-viraux correspondent à une autre catégorie de vecteurs qui ont été développés pour répondre au besoin de disposer de vecteurs non pathogènes à la différence des virus. Leur production est souvent plus facile et moins coûteuse, mais les taux de transfection restent inférieurs à ceux atteints lors de l'utilisation d'un vecteur viral.

Les vecteurs non viraux doivent lever de nombreuses barrières afin de pouvoir être utilisés *in vivo* (Figure 30). Ils doivent avoir une demi-vie assez longue dans le système circulatoire et aussi pouvoir traverser la membrane plasmique. D'autres vecteurs non viraux provoquent une endocytose. Il est alors nécessaire que le vecteur puisse se libérer de l'endosome. Une fois dans le cytoplasme, le vecteur non-viral doit libérer le transgène et/ou le guider jusqu'au noyau cellulaire. Les mécanismes du fonctionnement de ces vecteurs ne sont pas encore tous élucidés (en particulier, le passage des acides nucléiques dans le noyau cellulaire après décomplexation) [170]. Cependant, seule une très petite quantité des molécules d'acides nucléiques du vecteur arrive à destination dans le noyau d'une cellule cible viable. Le taux de transfection réussie avec expression du transgène est très faible par rapport à celui obtenu avec des vecteurs viraux, en particulier lorsque les cellules cibles ne sont pas en division.

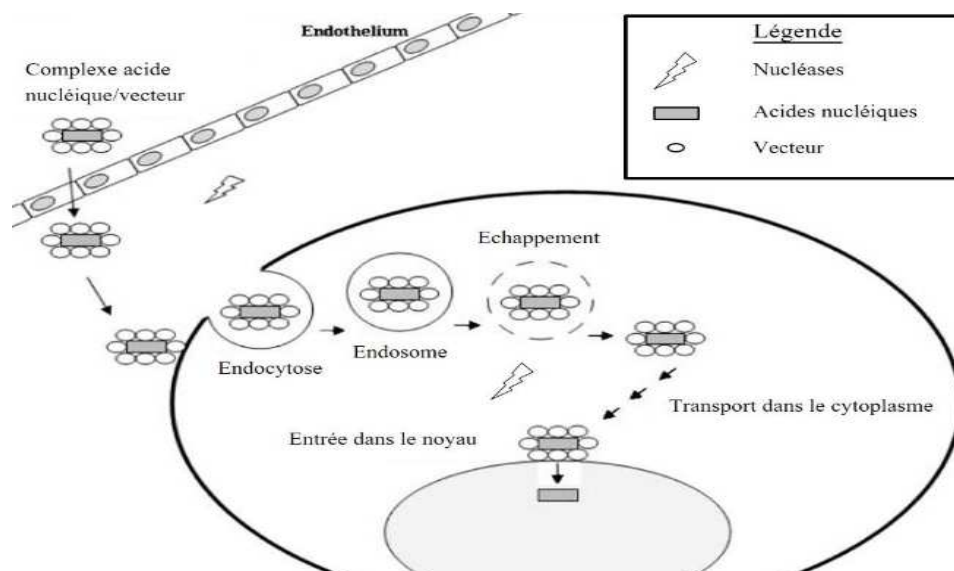


Figure 33 : Représentation des barrières qui limitent l'utilisation de vecteurs non viraux in vivo

A la différence des virus, la plupart des vecteurs non-viraux ne sont pas naturellement spécifiques d'un type cellulaire et cela reste le plus grand défi à relever pour cette famille de vecteurs si on veut pouvoir l'utiliser in vivo.

4.2.1. Les vecteurs chimiques

4.2.1.1. Les lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des lipides formés par une chaîne hydrophobe et une tête hydrophile chargée positivement. Ce type de lipides s'est révélé être le plus efficace dans la fabrication de vecteurs en thérapie génique. Il est possible de former avec ces lipides des liposomes qui sont des bicouches lipidiques sous forme de micelles. L'ADN chargé négativement interagit avec les charges positives des lipides et crée spontanément des lipocomplexes ou lipoplexes.

A la différence de la production de vecteurs viraux, les lipides cationiques sont très peu coûteux à produire. Ils ne sont pas pathogènes et provoquent une faible réponse immunitaire. Ils sont capables de transporter de grande quantité d'ADN (voire des chromosomes entiers) et peuvent être modifiés afin de cibler des cellules spécifiques via des lipoprotéines ou des anticorps insérés dans la bicouche lipidique [160, 171].

Cependant, on observe une certaine cytotoxicité lors de fusion avec les membranes cellulaires (plasmique, endosomale ou lysosomale) due à la présence du groupement hydrophile chargé positivement, le plus souvent une amine tertiaire ou quaternaire. A cause du mécanisme de clairance hépatique (demi-vie très courte des liposomes), on n'observe qu'un faible taux de transfection [172]. Lors d'injection systémique, les liposomes peuvent provoquer des réactions d'hypersensibilité. L'addition de certains composés chimiques (comme le polyéthylène glycol) permet de réduire leur toxicité tout en les stabilisant [173].

Des liposomes sont actuellement fabriqués et vendus par différents laboratoires : la **Lipofectamine 2000**® est un liposome commercialisé par le laboratoire *Life Technologies*, fréquemment utilisé comme gold standard lors d'études sur un nouveau vecteur non viral.

4.2.1.2. Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des assemblages de macromolécules (comme des hydrocarbures, des monosaccharides, ...) modifiés par différentes réactions chimiques afin de posséder les groupements chimiques nécessaires à leur fonction (ici, des groupements cationiques). Ils forment des polyplexes quand ils sont associés à de l'ADN. Ils sont, à la différence des lipides cationiques, totalement solubles dans l'eau et ont l'avantage de pouvoir condenser l'ADN en des particules de petite taille, ce qui semble permettre une transfection plus efficace [174]. Les polymères à base de chaînes hydrocarbonées hydrophobiques se sont montrés les plus aptes au transport d'acides nucléiques. Les polymères sont des molécules faciles à modifier par l'ajout ou le retrait de différents groupements ce qui en fait un sujet d'étude très vaste. Il est

possible, comme avec les liposomes, de leur adjoindre des groupements permettant le ciblage tissulaire. Les groupements amine et arginine semblent être déterminants dans le mécanisme d'échappement aux endosomes même si le mécanisme reste encore obscur [170, 175].

Cependant, plus leur capacité à transfecter les cellules augmente (présence de groupes hydroxyl, le ratio charges positives/ADN, longueur des chaînes de carbone ...), plus leur toxicité est élevée. Des moyens pour diminuer cette cytotoxicité sont à l'étude comme l'utilisation de polyéthylène glycol pour entourer les nanoparticules [176].

De nombreux polymères sont à l'étude, le polyéthylèneimine (PEI) et le polypropylèneimine étant les plus étudiés. Des travaux ayant pour objectif de les modifier pour diminuer leur toxicité et augmenter leur capacité de transfection sont en cours [157]. D'autres études se concentrent sur les polymères à base de chaînes aliphatiques de carbonates (succession de groupes - O – C (O) – O) [177].

4.2.1.3. Les polymères biodégradables

Il est démontré que les polymères biodégradables (comme les poly-amido-amines) ont une plus faible cytotoxicité que les polymères et lipides cationiques. Afin de créer des polymères biodégradables, il faut créer des liaisons hydrolytiques ou bioréductibles au sein du polymère notamment par l'addition de groupement disulfide[175]. Cela réduit jusqu'à cent fois la toxicité du polymère par rapport à un polymère classique comme le polyéthylèneimine.

Il est également possible d'utiliser des macromolécules biocompatibles. Nous prendrons ici deux exemples bien étudiés.

Le **chitosane** (dérivé de la chitine) est un polysaccharide très étudié car biodégradable, biocompatible et qui possède des charges positives. Cependant, sans modification il reste peu performant comme vecteur. Mais associé à différents groupements, le **chitosane** devient un support très prometteur [178].

La **gélatine** (dérivée du collagène animal) est déjà très utilisée dans l'industrie pharmaceutique en raison de ses caractères biocompatible et biodégradable. Elle est

approuvée par la FDA et est très peu chère à produire. Des études ont montré qu'il était possible de créer des nanoparticules de gélatine capables de transporter des acides nucléiques (par encapsulation, complexation avec des groupements de surface ou par attraction électrostatique). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré le potentiel de la gélatine comme vecteur non viral par rapport à l'ADN nu et la Lipofectamine®. Cependant, la majorité de la gélatine produite vient de l'industrie animale ce qui rend ce produit susceptible de transmettre des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles. De la gélatine humaine recombinante est disponible sur le marché et considérée comme moins à risque. Cette gélatine est plus homogène et semble mieux convenir à la préparation de nanoparticules. A l'heure actuelle, la gélatine est surtout étudiée pour le transport de médicaments de nature autre que les acides nucléiques [179].

Une différence majeure apparaît dans le transport des acides nucléiques : les siARN et autres oligonucléotides bénéficient d'un relargage rapide dans le cytoplasme alors que l'ADN doit être protégé des nucléases cytoplasmiques le plus longtemps possible afin d'être efficacement transporté jusqu'au noyau. Ainsi, deux types de biodégradabilité sont à l'étude : une rapide (grâce par exemple aux groupements disulfides qui permettent une libération de l'acide nucléique lors du passage du vecteur en milieu intracellulaire) et une plus progressive [170].

4.2.1.4. Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont des structures cylindriques formées par des feuilles de graphite concentriques. Leurs dimensions sont de 1 nanomètre de diamètre et de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres de longueur. On les classe en deux catégories selon le nombre de couches de graphite (une ou plusieurs).

Afin de pouvoir remplir leur rôle de vecteur et principalement afin de pouvoir se lier aux acides nucléiques, les nanotubes de carbone doivent être modifiés en surface par différentes réactions chimiques [180].

De nombreuses études ont déjà été menées afin de déterminer la modification la plus efficace et la moins toxique (**Figure 31**). Différents groupements cationiques ont été utilisés : des polymères comme le PEI, des polymères dendritiques (cf. paragraphe suivant), des lipides cationiques et autres nanoparticules. Leurs mécanismes d'action précis sont toujours inconnus.

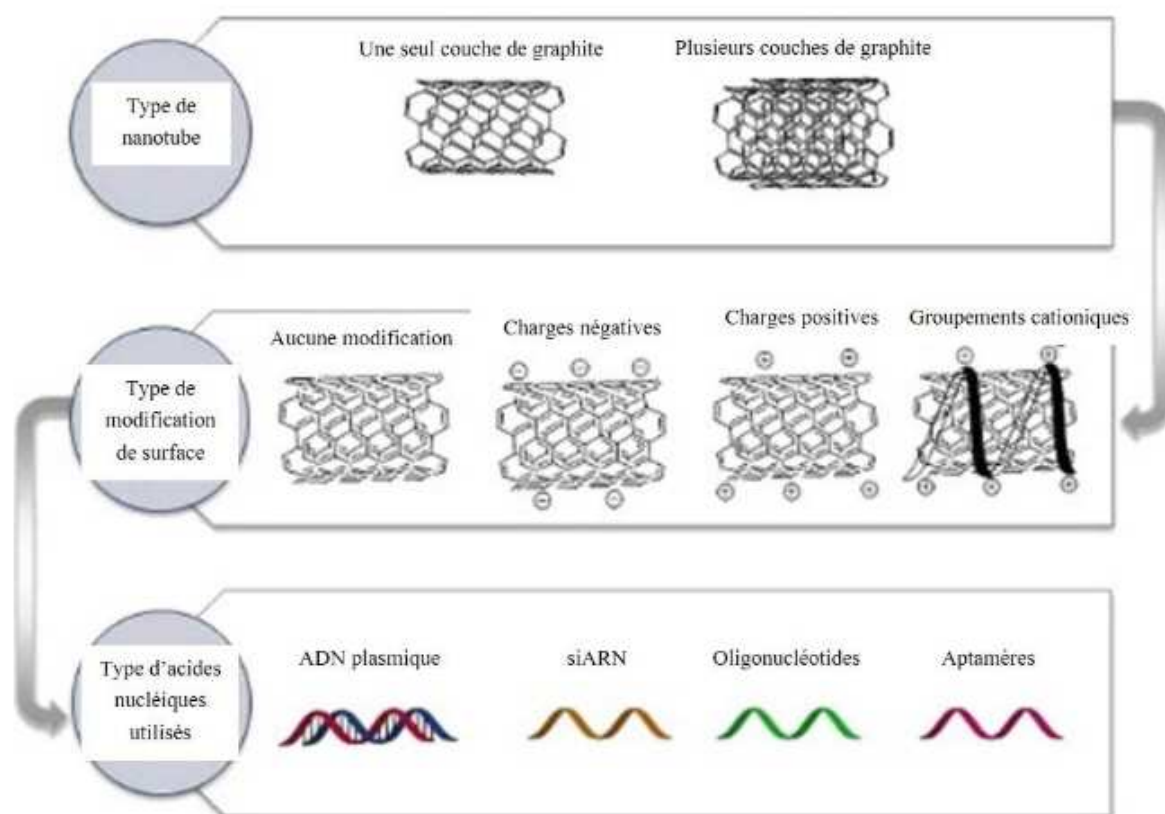


Figure 34 : Combinaisons à base de nanotubes de carbone étudiées[180]

L'efficacité des nanotubes de carbone a surtout été démontrée in vitro et d'autres études sur la toxicité doivent être réalisées avant que le nanotube modifié devienne le vecteur non viral de choix en thérapie génique [181].

4.2.1.5. Autres nanoparticules non virales

De très nombreuses nanoparticules synthétiques ou naturelles sont à l'étude comme potentiel vecteur en thérapie génique. Seuls quelques exemples intéressants seront développés ici.

Les polymères dendritiques (ou dendrimères) :

Ce sont des macromolécules synthétiques, de l'ordre de grandeur du nanomètre, construites en trois dimensions. Il est possible d'y attacher un gène par liaison covalente ou par liaison électrostatique car ils possèdent de nombreux groupes hydrophobes, hydrophiles, cationiques et anioniques qu'on peut modifier [182]. Les dendrimères de poly-amido-amines ou PANAM sont actuellement les dendrimères les plus prometteurs de par leur biocompatibilité et leur capacité à transfecter les cellules [183].

Les nanoparticules de phosphate de calcium :

Le plus grand avantage de ces nanoparticules est qu'elles sont totalement biocompatibles et biodégradables car le phosphate de calcium est un élément présent chez les animaux et l'Homme sous forme d'os. Des études in vitro ont montré la capacité des nanoparticules de phosphate de calcium à transporter des acides nucléiques et à transfecter les cellules. Ces nanoparticules nécessitent une préparation spéciale afin d'éviter la précipitation ou l'agglomération et des modifications de surface pour les stabiliser in vivo [184].

Les nanoparticules d'or :

Ces nanoparticules ont la caractéristique de pouvoir relâcher les acides nucléiques qu'elles transportent, quand elles sont soumises à une onde lumineuse (800 à 1200nm de longueur d'onde) ou une onde électrique. Elles sont aussi non toxiques et capables de protéger les acides nucléiques transportés contre les nucléases endogènes [185].

Les nanoparticules à double couche hydroxyde :

C'est une famille de cristaux dont la formule générale est $[M_n^{II}M^{III}(OH)_{2+2n}](A^{m-})_{1/m} \times H_2O$ ($n = 2-4$) où M^{II} est un cation métallique divalent, M^{III} un cation métallique trivalent et A^{m-} un anion. Ces nanoparticules présentent une grande biocompatibilité, une faible cytotoxicité et une capacité à relâcher leur chargement en fonction du pH. Elles sont capables de lier des acides nucléiques par liaison électrostatique. Ces cristaux peuvent prendre différentes formes. Les formes hexagonales semblent rester dans le cytoplasme alors que les formes circulaires passent la membrane nucléaire. Leur stabilité reste à étudier afin de pouvoir les utiliser *in vivo* [186].

4.2.2. Les acides nucléiques nus

L'utilisation d'acides nucléiques dits nus (car non liés à une autre molécule) comme vecteur non viral en thérapie génique est pratiquée depuis plus de vingt ans. L'ADN nu ne provoque pas de réponse immunitaire et est facile à produire via des systèmes bactériens et les techniques d'ADN recombinant. On crée alors des plasmides recombinants contenant une origine de réplication, un promoteur et la séquence d'intérêt. Une des limites principales de l'utilisation des acides nucléiques nus est qu'ils ont une demi-vie très courte en raison de l'action des nucléases endogènes. L'autre limite est que l'expression du transgène est transitoire la plupart du temps. Plusieurs hypothèses ont été formulées à ce sujet [187]:

Activation du système immunitaire contre le plasmide par des séquences d'ADN bactérien résiduelles (qui ne présentent pas de méthylation)

Inactivation du promoteur s'il est viral. Les promoteurs viraux sont très utilisés (par exemple, la séquence LTR des rétrovirus) car il est démontré que ces derniers provoquent une expression massive du transgène à la différence des promoteurs tissu-spécifique [188].

Nombreuses mitoses induisant la perte du transgène non intégré

Grâce à des méthodes physiques pour améliorer la transfection, le taux d'expression du transgène peut atteindre celui d'une transfection par vecteur viral [189].

4.2.2.1. Micro injection

Cette technique consiste à injecter directement les transgènes nus par le biais d'une solution d'acides nucléiques dans le cytoplasme ou le noyau des cellules grâce à des aiguilles de 0.5 à 5 μm de diamètre et un microscope optique spécialisé appelé micromanipulateur. Cette technique est lourde à réaliser et se retrouve donc reléguée derrière les autres méthodes physiques. Elle est aujourd'hui surtout utilisée en transgénèse animale [132].

4.2.2.2. Gene gun

La technique du « gene-gun » (ou pistolet à gènes) consiste à injecter dans les tissus cibles, à très grande vitesse, grâce à un gaz pressurisé, des microparticules d'or ou de tungstène (1 à 3 μm de diamètre) recouvertes d'acides nucléiques [154]. Cette méthode a été développée pour la création de plantes transgéniques dans les années 80. Cependant, il a été démontré que l'utilisation de cette méthode provoquait une réponse immunitaire plus importante que celle induite par la micro-injection d'ADN et ce, avec un apport d'une quantité d'acide nucléique moindre. Actuellement, la technique du « gene-gun » est essentiellement utilisée dans la vaccination à partir de gènes ou vaccination ADN [132].

4.2.2.3. Techniques hydrodynamiques

Cette technique consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse (les quantités dépendent du modèle animal choisi). Cette technique a été initialement décrite en utilisant la veine de la queue comme voie intraveineuse. Le mécanisme est le suivant : l'injection rapide d'un bolus provoque une congestion du cœur ce qui fait refluer le sang et le bolus dans le système veineux (veine cave inférieure et veine porte principalement). L'augmentation de la pression veineuse provoque une dilatation des fenestrations des capillaires sanguins irrigant le foie et

perméabilise les membranes plasmiques permettant ainsi l'entrée des acides nucléiques. Tous les paramètres systémiques reviennent à la normale en quelques minutes et les membranes plasmiques sont restaurées en 48 à 72h.

Par cette technique, les hépatocytes sont les cellules qui présentent l'expression génétique du transgène la plus importante. Des cellules du cœur, des poumons, de la rate et des reins montrent aussi une expression, mais 10 000 fois inférieure aux hépatocytes. Cette technique est aussi utilisable pour transfecter d'autres tissus comme des muscles en bloquant la circulation sanguine le temps de l'injection. On peut utiliser des plasmides d'ADN ou d'autres molécules (siARN, oligonucléotides, ...)

Le taux de transfection est de 30% à 40%, ce qui est le taux le plus important décrit en utilisant un vecteur non viral [190].

4.2.2.4. Electroporation

L'électroporation consiste à appliquer un courant électrique à un tissu pour faciliter l'entrée des acides nucléiques dans les cellules en créant des pores membranaires.

Il a été démontré que les courtes impulsions (100 μ s) de haut voltage permettaient de perméabiliser les membranes plasmiques et que les longues impulsions (100ms) de bas voltage permettaient de guider l'ADN dans les cellules. Le voltage dépend du type d'application (directe ou en transcutané), du modèle d'étude ainsi que du tissu (les hépatocytes semblent résister à un courant plus fort que les cellules musculaires), sachant qu'il doit rester assez faible afin de ne pas détruire les cellules transfectées. Cette technique est principalement utilisée in vitro. L'utilisation in vivo se limite aux cellules cutanées [191].

4.2.2.5. Nucléofection

Dérivée de la recherche sur l'électroporation, cette technique est actuellement la méthode électrique la plus sûre. Par l'association d'impulsions électriques avec une solution spécifique pour le transport des acides nucléiques, cette technique transporte les acides nucléiques directement dans le noyau des cellules. Elle a le grand avantage de permettre la transfection de cellules se divisant peu ou quiescentes

et elle est très reproductible. Des kits de nucléofection sont disponibles sur le marché pour une utilisation in vitro uniquement (Exemple : **Nucleofector®**) [192].

4.2.2.6. Sonoporation

La sonoporation est le nom donné au mécanisme provoquant la formation de pores sur la membrane plasmique sous l'effet des ultrasons.

L'utilisation de microbulles est désormais presque incontournable car elles permettent d'augmenter le taux de réussite de cette méthode. Les microbulles sont des particules remplies de gaz délimitées par une couche protéique ou lipidique. Ces microbulles peuvent être utilisées comme vecteur et être modifiées afin de pouvoir transporter des acides nucléiques (par exemple, en incorporant des lipides cationiques) et de pouvoir cibler les cellules d'intérêt (par l'insertion d'anticorps).

Les microbulles réagissent de deux façons aux ultrasons. A basse fréquence, les microbulles oscillent (expansion/rétrécissement) de façon linéaire jusqu'à entrer en résonance et osciller de façon stable. On appelle cela la cavitation stable. A haute fréquence, les microbulles oscillent de plus en plus vite jusqu'à l'effondrement des microbulles à cause de l'inertie du liquide environnant. On appelle cela la cavitation inertielle (**Figure 32**).

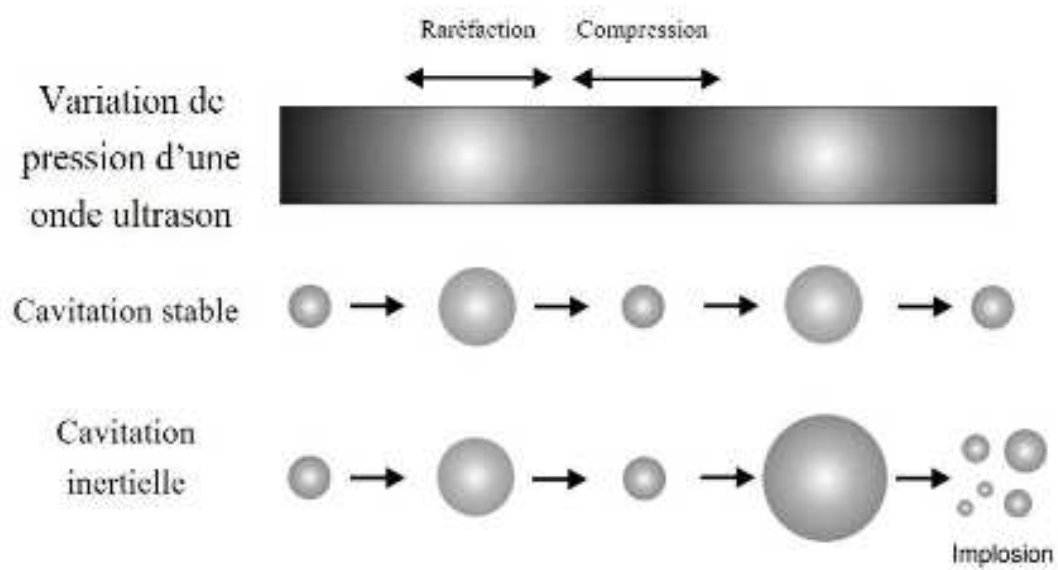
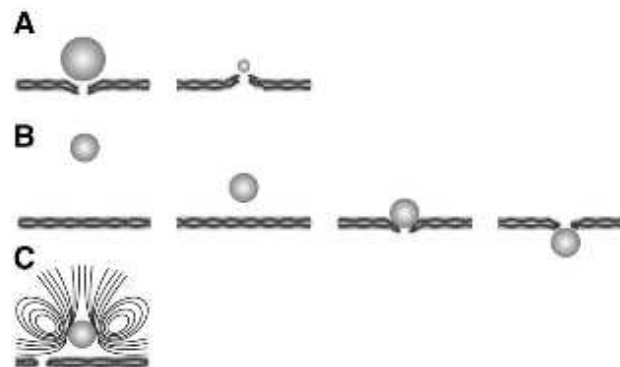


Figure 35 :Schématisation de la réaction des microbulles aux ultrasons[192]

Les effets physiques sur la membrane plasmique des deux types de cavitation sont représentés sur les **Figures 33 et 34**.



Légende

- A : Formation d'un pore par poussée en phase d'expansion (à gauche) et succion en phase de rétrécissement (à droite)
 B : Microbulle poussée à travers la membrane plasmique par les ultrasons
 C : Formation d'un pore par la formation de micro-courants dans le fluide environnant par oscillation stable de la microbulle

Figure 36 :Effets physiques de la cavitation stable[192]



Légende

- A : Formation d'un pore par les ondes de choc provoquées par l'effondrement de la microbulle
 B : Micro-jet formant un pore lors de l'effondrement de la microbulle (asymétrique car proche d'une surface)

Figure 37 :Effets physiques de la cavitation inertielle[192]

Les deux types de cavitation provoquent aussi la formation de résidus super-oxydes qui modifient les canaux ioniques et entraînent la formation de pores par peroxydation des phospholipides membranaires.

De plus, il semble que les ultrasons augmentent le nombre d'endocytose/exocytose par modification de la concentration intracellulaire en calcium et par modification du cytosquelette [193].

La modification des microbulles est essentielle afin de perfectionner la sonoporation et d'en faire une méthode efficace de transfert d'acides nucléiques.

4.3. Perspectives d'améliorations

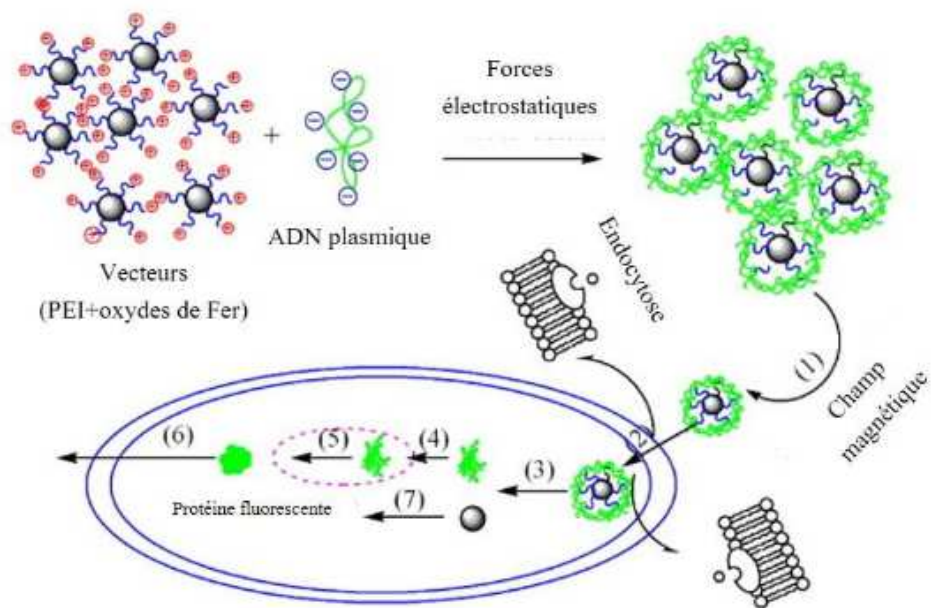
En parallèle de l'amélioration de la structure des vecteurs (viraux et non viraux), la recherche s'intéresse aussi à des méthodes permettant d'augmenter le taux de transfection et la stabilité de l'expression du transgène tout en diminuant la toxicité en faisant appel à différents systèmes.

Voici quelques exemples de méthodes prometteuses. Il est à noter que ces molécules peuvent aussi être utilisées seules comme vecteur.

4.3.1. Les nanoparticules magnétiques

Il est possible d'attacher un vecteur (viral ou non) à une nanoparticule magnétique telle que la Magnétite (Fe_3O_4) ou Maghémite (Fe_2O_3) (sous forme de cristal de 5 à 20 nm). Il est alors possible de guider le vecteur (et l'ADN qu'il transporte) injecté par voie intraveineuse ou intrapéritonéale par un aimant positionné au niveau du site ciblé et qui crée un champ magnétique localisé [194].

Zheng et al ont montré qu'il était possible de créer un vecteur stable à partir de PEI et d'oxyde de Fer magnétique et que ce vecteur pénétrait les cellules par voie d'endocytose (**Figure 35**).



Légende

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| (1) : Administration du vecteur | (5) : Expression |
| (2) : Endocytose | (6) : Traduction |
| (3) : Relargage intracellulaire | (7) : Expulsion de l'oxyde de Fer |
| (4) : Entrée dans le noyau | |

Figure 38 :Schématisation du fonctionnement d'un vecteur magnétique codant pour l'expression d'une protéine fluorescente [195]

Wang et son équipe ont prouvé que leur vecteur magnétique, fabriqué à partir de PEI, chitosane et de nanoparticules d'oxyde de Fer incluses dans des micelles, était non toxique pour les cellules transfectées, biocompatible et sûr en utilisation *in vivo*[196].

Mannell et al ont démontré que l'utilisation de nanoparticules magnétiques en association avec la technique de sonoporation permettait de guider les microbulles vers le tissu cible et d'augmenter ainsi le taux de réussite de cette technique[197].

L'utilisation d'un champ magnétique a aussi pour effet d'augmenter le taux de transfection par agrégation en un court laps de temps de très nombreux vecteurs autour des cellules cibles ce qui augmente la probabilité qu'un vecteur pénètre la cellule. Les mécanismes de pénétration ne semblent pas modifiés par le champ magnétique. L'utilisation d'un champ pulsé par rapport à un champ statique augmenterait encore plus le taux de transfection. L'étude de l'utilisation d'un champ magnétique alternatif doit encore être approfondie [198].

Cette méthode, qui en est à ses débuts, serait une solution parfaite pour le ciblage des tissus à traiter lors d'utilisation de vecteurs non viraux ainsi que pour réduire la quantité de vecteurs nécessaires à une transfection efficace (de fortes doses de vecteurs provoquant le plus souvent une toxicité ou une réponse immunitaire)[194].

4.3.2. Les systèmes transposon/transposase Sleeping beauty

Le système Sleeping Beauty est l'association d'un transposon (séquence d'ADN mobile) avec une transposase, enzyme qui catalyse l'excision et la réintégration du transposon. Ce système a été découvert chez la souris.

La (Figure 36) montre le fonctionnement du système transposon/transposase.

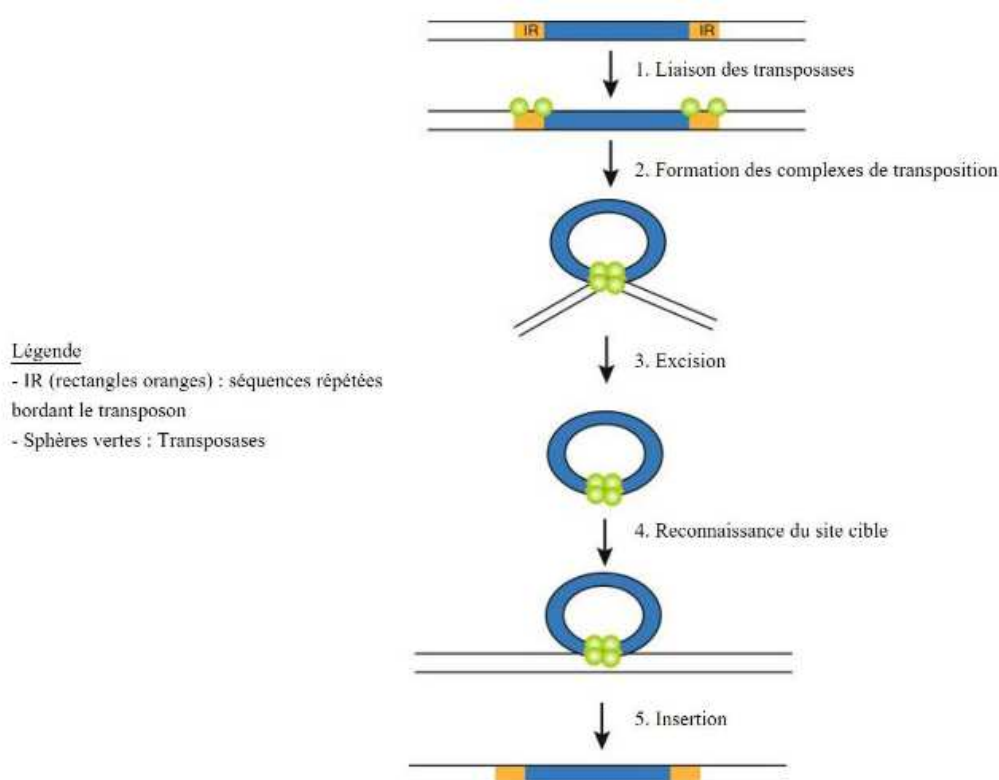


Figure 39 :Schématisation du fonctionnement d'un système transposon/transposase [199]

Associé à une séquence d'ADN sous la forme d'un plasmide, le système Sleeping Beauty est capable d'intégrer la séquence génétique d'intérêt dans le génome de la cellule transfectée[200]. Afin de parfaire ce système, de nouvelles transposases plus efficaces ont été développées. Le système amélioré s'appelle Sleeping Beauty hyperactif [201].

D'autres systèmes transposons/transposase (Tol2, PiggyBac) sont connus, mais semblent moins efficaces que le système Sleeping Beauty [131].

L'avantage de ce système, par rapport aux vecteurs viraux et aux autres systèmes transposon/transposase est que son intégration semble être dirigée vers des lieux

sûrs (« safeharbor »), loin des gènes transcrits et que son promoteur/enhancer est peu actif ce qui empêche la surexpression de gènes environnants.

4.3.3. Les aptamère

Les aptamères sont des séquences d'acides nucléiques, simple brin, de petite taille capables de se lier spécifiquement à des protéines ou à d'autres cibles cellulaires. Leurs séquences sont conçues à partir de banques de séquences et sélectionnées par différentes méthodes de sélection comme SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) ou plus récemment AptaBid. Ils ont l'avantage de ne pas déclencher de réponse immunitaire, mais ont une demi-vie courte due à l'action des nucléases. Il est possible de les modifier (modification des nucléotides en fin de séquence afin qu'ils ne soient pas reconnus par les endonucléases, utilisation de nucléotides modifiés dans la séquence comme les 2'-O pyrimidines modifiées) afin d'allonger leur demi-vie.

Les aptamères peuvent être utilisés comme vecteurs en thérapie génique grâce à leur grande spécificité et leur capacité à se lier à des protéines membranaires permettant leur internalisation. Cependant, ils ne peuvent transporter que des séquences nucléiques de petite taille (comme les siARN).

Les aptamères peuvent aussi être utilisés pour renforcer ou créer une spécificité de tissu : positionnés en surface d'un vecteur, ils peuvent agir comme le feraient des anticorps en ciblant une protéine de surface vis-à-vis de laquelle ils présentent une affinité. Leur dernière utilisation consiste à les employer en tant qu'outil de thérapie génique car ils peuvent, en se liant, inhiber les fonctions de certaines protéines, telles que les facteurs angiogéniques[202].

Kotula et son équipe ont démontré *in vitro* que l'utilisation de chimères comprenant un aptamère et une protéine nucléolaire appelée la nucléoline, permettait une livraison efficace de la séquence nucléique d'intérêt directement dans le noyau cellulaire [203].

6. Edition thérapeutique du génome

6.1. Historique

En 1901, Sir Archibald Garrod identifia l'alkaptonurie comme la première maladie génétique humaine connue. Aujourd'hui, nous reconnaissons qu'il y a au moins 8 000 maladies humaines causées par des mutations dans des gènes uniques (maladies monogéniques); ce nombre augmente presque chaque jour. Bien que toutes ces maladies soient classées comme "rares", elles peuvent toucher plus de 400 millions de personnes dans le monde. Certaines, comme la drépanocytose, touchent des dizaines de millions de personnes dans le monde et ne sont "rares" que dans certaines parties du monde, notamment aux États-Unis, en Europe et en Asie de l'Est. Pour un petit sous-groupe de patients, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (allo-HSCT) ou la transplantation d'organes solides peut être utilisée pour guérir leur maladie génétique, mais pour la grande majorité des patients, il n'y a pas de remède et, dans les meilleurs des cas, ils sont traités par la prise en charge des symptômes. L'édition thérapeutique du génome est née de l'idée que la thérapie idéale pour les maladies monogéniques serait de mettre au point une méthode qui peut corriger directement les mutations à l'origine de la maladie, mais comme l'édition du génome s'est développée parallèlement à l'amélioration continue de notre compréhension de la contribution génétique aux maladies non monogéniques, le principe de l'édition du génome est en cours de développement non seulement pour guérir les maladies monogéniques, mais aussi pour guérir les maladies plus courantes qui ont des origines multifactorielles. L'utilisation de l'édition du génome pour guérir les maladies monogéniques est conceptuellement simple (l'édition du génome peut être utilisée pour corriger les erreurs de typographie génomique sous-jacentes), mais la puissance de l'édition du génome est qu'elle fournit un mécanisme qui peut faire plus que simplement modifier les nucléotides simples. C'est une méthode qui peut apporter des changements génomiques plus sophistiqués et nuancés, qui peuvent être utilisés pour guérir des maladies plus courantes ou modifier leur

évolution. La nature exacte de l'édition thérapeutique doit être guidée par une solide compréhension de l'interaction entre la génétique sous-jacente et la pathophysiologie spécifique de la maladie. En d'autres termes, une stratégie d'édition peut être appropriée pour une maladie, mais non applicable à une autre[125].

6.2. La thérapie génique ciblée : Développement de nouvelles approches d'édition de génome

De nombreuses maladies humaines ont des causes génétiques. « Réparer » le génome constitue un espoir et une piste thérapeutique prometteuse. Les premières recherches sur le génome humain à buts thérapeutiques ont débuté à la fin des années 1990.

La thérapie génique est apparue il y a vingt ans. Si le concept de la thérapie génique, soigner ou prévenir des maladies en remplaçant un gène défectueux ou en régulant l'expression d'un gène altéré date des années 50, celle-ci ne s'est concrétisée que dans les années 1990, avec les premiers essais conduits sur l'homme. C'est le Dr Marina Cavazzana Calvo et le Pr Alain Fischer (de l'unité 429 de l'INSERM à l'hôpital Necker) qui, en 2000, a permis de les appliquer sur de très jeunes enfants atteints d'une forme de déficit immunitaire (DICS –X«Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X»)[204].

La thérapie génique est l'administration de matériel génétique pour modifier ou manipuler l'expression d'un produit génique ou pour modifier les propriétés biologiques des cellules vivantes à des fins thérapeutiques. Les thérapies géniques offrent la possibilité de traiter des maladies ou des affections pour lesquelles il n'existe pas ou peu de traitements.

Toutefois, l'avènement récent des technologies d'édition du génome a permis de créer un nouveau paradigme dans lequel la séquence du génome humain peut être manipulée avec précision pour obtenir un effet thérapeutique. Ceci comprend la correction des mutations qui causent la maladie, l'ajout de gènes thérapeutiques à des sites

spécifiques dans le génome et l'élimination de gènes délétères ou de séquences du génome [205].

Après la démocratisation du séquençage du génome, après vingt ans de thérapies géniques, après les doigts de zinc et les TALEN, CRISPR-Cas9 complète la panoplie des techniques et fait renaître de grands espoirs pour soigner non seulement des maladies génétiques, mais aussi le cancer, le sida et d'autres maladies. La FDA considère toute utilisation d'édition du génome par le système CRISPR/Cas9 chez l'homme comme une thérapie génique [206].

La baisse significative du coût de ces recherches a permis la multiplication des projets à travers le monde ; des essais cliniques sont mêmes en cours et des patients ont déjà été guéris par l'utilisation de ces nouvelles biotechnologies.

Cependant, leur application, mais surtout leurs potentialités, posent des questions éthiques et doivent conduire les États à s'interroger sur une législation qui n'a pas pu forcément anticiper ces avancées de la science.

Les progrès des technologies d'édition du génome pour faire des ajouts, des suppressions et des modifications précises à l'ADN ont suscité de l'intérêt dans le monde entier en raison de la promesse d'améliorer la santé humaine. Par exemple, la révision du génome est mise à l'essai dans le cadre d'essais cliniques afin de concevoir des cellules immunitaires pour cibler les cellules tumorales cancéreuses et rendre les cellules plus résistantes au VIH. La révision du génome pourrait également servir à mettre au point de nouveaux traitements pour des maladies génétiques dévastatrices comme la maladie de Huntington, la drépanocytose, les déficiences immunitaires, la dystrophie musculaire et la fibrose kystique. Comme c'est le cas pour les autres progrès médicaux, chaque nouveau potentiel l'utilisation de la révision du génome comporte un ensemble unique d'avantages et de risques, les questions de réglementation et les implications sociétales [207].

6.3. Edition du génome : Une modification ciblée du génome

6.3.1. Le mécanisme fondamental d'édition génomique

Avec les nouveaux outils développés dans les dernières années en biologie moléculaire, il est possible maintenant d'envisager la modification du génome humain de façon spécifique.

En fait, Lorsqu'on utilise un outil d'édition de génome, on vise normalement à causer une cassure double brin dans la molécule d'ADN, et ce, en ciblant un gène de façon spécifique. Suite à cette cassure, les mécanismes de réparation endogènes s'activent et cherchent à corriger la mutation que notre système d'édition a causée [125]. La cellule hôte dispose de deux mécanismes majeurs pour réparer le génome au niveau du site de coupure double brin. Soit le NHEJ (pour Non Homologous End Joining) soit le HDR (pour Homology Directed Repair), chacun a des propriétés différentes et donc des applications bien particulière (Figure 37).

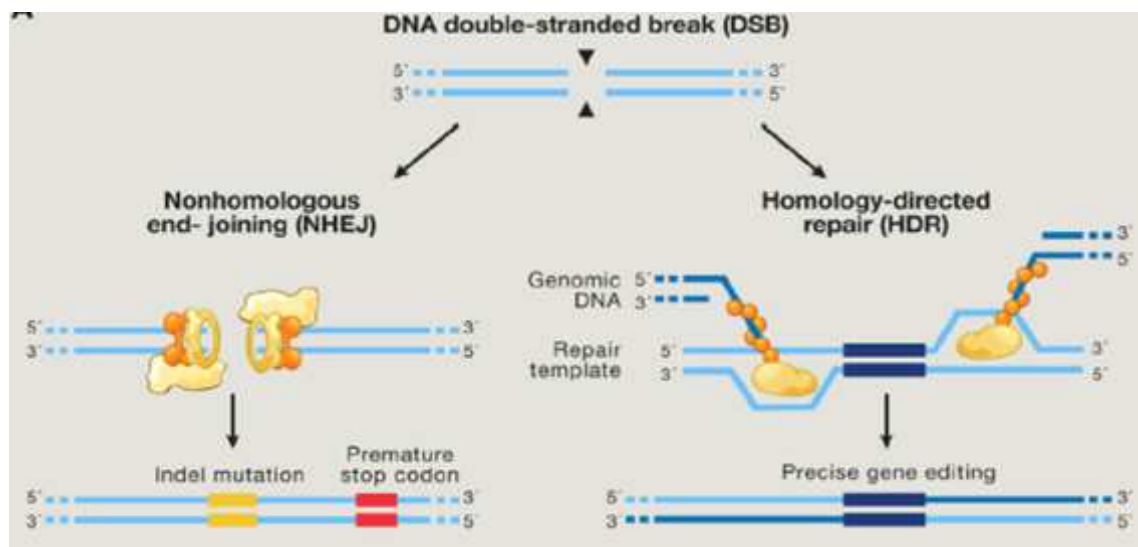


Figure 40 : Mécanismes endogènes impliqués dans la réparation d'une coupure double brin de l'ADN

[208]

6.3.1.1. La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)

La Jonction d'extrémités non homologues « non homologous end-joining (NHEJ) » dans la plupart des cas, introduisant des petites insertions ou délétions (INDELs) au site de coupure. De cette façon, il est possible d'envisager de corriger le cadre de lecture d'un gène muté, ou même faire l'inhibition d'un ou plusieurs gènes [125, 205].

Comme technique de réparation cellulaire, NHEJ a l'avantage d'être active tout au long du cycle cellulaire. Ainsi, cette technique n'a pas besoin d'un brin donneur ou de chromatides sœurs, ce qui fait que la réparation se fait rapidement et permet la continuité du cycle cellulaire. NHEJ se fait principalement en 3 étapes, soit la liaison et recrutement au niveau des brins cassés, la terminaison des brins et leur ligation.

Cette voie est donc la voie de choix pour générer des knock-out mais son caractère aléatoire entraînera une population cellulaire expérimentale où les mutations apparues sont hétérogènes [209].

6.3.1.2. La Recombinaison homologue (HDR)

Contrairement au NHEJ cette voie utilise un brin donneur/modèle pour combler la coupure. Lorsque le brin donneur est présent, c'est cette voie qui sera prépondérante. En présence de l'ADN donneur, ayant des séquences homologues aux extrémités de la cassure, il est possible aussi d'induire son introduction dans ce site spécifique. La recombinaison homologue «homology-directed repair (HDR)» permet d'insérer les parties manquantes des gènes mutés [125, 205]. C'est cette voie qui sera préférée pour réaliser avec précision des mutations, insertions et délétions par le biais d'une séquence donneur : c'est le knock-in. En prenant pour précaution, dans le cas de CRISPRcas9, de s'assurer de l'absence de PAM dans la séquence donneur, afin qu'elle ne soit pas à son tour découpée [210].

6.3.1.3. Rôle du cycle cellulaire dans le choix de mécanismes de réparations

Bien que les cellules possèdent différents mécanismes de réparations (le NHEJ et l'HDR) c'est la phase du cycle cellulaire qui gouverne principalement le choix entre ces deux voies. Le NHEJ est dominant pendant les phases G1, S et G2 tandis que l'HDR est limité à la fin des phases S (phase de synthèse) et G2 (la deuxième sous-phase de l'Interphase) [211], lorsque la réplication de l'ADN est complète et les chromatides soeurs sont disponibles pour servir de matrice de réparation. En pratique, cela limite la réalisation de knock-in par la Cas9 et ses guides ARNs aux cellules en division et restreint donc cette approche, surtout in vivo. Plusieurs artifices peuvent être déployés pour contourner cette limitation [212-215]. D'autres voies mineures de réparation de l'ADN tels que le single strand annealing, alternative end joining, microhomologymediated end joining, mismatch base nucleotide ou excision repair peuvent aussi être utilisées pour éditer le génome [209, 216-219].

6.3.2. Les nucléases programmables en tant qu'outils d'édition du génome

Dans l'évolution de l'ingénierie des génomes, plusieurs outils ont été développés. Actuellement, Il existe quatre outils qui permettent de faire des modifications ciblées du génome, l'un n'est plus utilisé, les méganucléases, il constitue la première génération d'outils, et trois le sont encore (**Figure 38**) : nucléases à doigts de zinc «zinc fingernucleases», TALEN «Transcription Activator-Like Effector Nucleases» et, le plus récent, CRISPR-Cas9 «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats –CRISPR associated protein 9».

Au milieu des années 1990s, des biologistes, découvrirent qu'en introduisant une cassure double brin au niveau d'un locus du génome (en utilisant une méganucléase, une endonucléase dotée d'un site de reconnaissance extrêmement peu fréquent), ils augmentaient énormément la fréquence de recombinaisons homologues, ainsi que son mécanisme alternatif de réparation le NHEJ [220]. Ils venaient de réaliser que pour

obtenir une édition génomique reproductible, il leur fallait une méthode efficace pour produire une cassure double brin à l'endroit voulu. La première stratégie pour obtenir ces DSB (Double Strand Break ou Coupure double brin) fut d'utiliser des ZFNs. Ces protéines sont composées de domaines de liaison à l'ADN à doigts de zinc fusionnées avec un domaine de clivage de l'ADN provenant d'une enzyme de restriction [221]. Pour le domaine nucléase, il est formé principalement par l'endonucléase FokI. Des publications montrèrent ensuite que les ZFNs étaient utilisables pour réaliser des éditions par recombinaison homologue chez l'animal notamment chez la drosophile et la souris [222, 223]. En 2005, c'est un groupe de Sangamo Biosciences qui rapporta la première modification chez des cellules humaines. Ils étaient parvenus à corriger une mutation du gène IL2R γ porté par le chromosome X, une mutation responsable de DICS (déficit immunitaire combiné sévère). Avec un taux de 18% de cellules « corrigées » dont 7% pour lesquelles la correction eut lieu au niveau des deux chromosomes X, l'expérience était un succès [224]. Ces résultats encourageants portaient les espoirs d'une application clinique des ZFN [225]. Cependant, la production de ZFN capable de reconnaître fidèlement des sites spécifiques s'avéra lente et pointilleuse. Une solution technique plus fiable vit le jour en 2009 après la découverte d'une nouvelle classe de protéines trans activatrices : les TALENs. Provenant de l'association artificielle entre une protéine d'une bactérie pathogène du végétal, le *Xanthomonas* [226, 227], et un domaine nucléase, les Transcriptor Activation-Like Effector Nucleases. Ces protéines utilisent un assemblage précis de séquences modulables pour cibler des séquences ADN choisies. Mais cette approche nécessite encore un travail considérable. Elle impose de créer une nouvelle protéine et de la valider avant chaque nouvelle expérience. Bien qu'encore utilisé, ce processus limite aujourd'hui leur vaste adoption. L'outil qui détrône ces précédentes techniques, qu'on nomme CRISPR-Cas9 est lui aussi emprunté par la biotechnologie au règne bactérien.

Cet outil possède plusieurs atouts par rapport aux meilleures nucléases ZFN et TALEN: la simplicité, la rapidité (mise au point pour un gène particulier en moins de deux semaines) et le coût (environ dix fois moindre).

Cette quatrième génération d'outils de modification ciblée du génome, dénommée CRISPR-Cas9, est décrite davantage ci-dessous. Il y a des différences subtiles entre chacune de ces plateformes des endonucléases, par exemple, le type de rupture qui est créé est différent. En général, cependant, chacune de ces plateformes produit ses effets d'édition par la création d'une DSB et elles partagent donc un mécanisme d'action fondamental.

6.4. CRISPR CAS9 : Une technologie révolutionnaire dans l'édition du génome

La technique CRISPR/Cas9 est l'un des nombreux outils d'édition de gènes. Beaucoup préfèrent la technique CRISPR/Cas9 en raison de son haut degré de flexibilité et de précision dans le découpage et le collage de l'ADN. L'une des raisons de sa popularité est qu'il permet de réaliser du génie génétique à une échelle sans précédent et à très faible coût. Ce qui la différencie des techniques de génie génétique antérieures, c'est qu'elle permet l'introduction ou l'élimination de plus d'un gène à la fois. Cela permet de manipuler de nombreux gènes différents dans une lignée cellulaire, une plante ou un animal très rapidement, ce qui réduit le processus de quelques années à quelques semaines. Il est également différent en ce sens qu'il n'est pas spécifique à une espèce et peut donc être utilisé sur des organismes précédemment résistants au génie génétique. Cette technique est déjà à l'étude pour un grand nombre d'applications dans des domaines allant de l'agriculture à la santé humaine. Dans le contexte de la santé, elle pourrait ouvrir la voie au développement de nouveaux traitements pour des maladies métaboliques rares et des maladies génétiques allant de l'hémophilie à la maladie de Huntington. Il est également utilisé dans la création d'animaux transgéniques pour produire des organes destinés à la transplantation chez l'homme. La technologie est également

à l'étude pour la thérapie génique. Plusieurs entreprises ont été fondées pour exploiter commercialement la technologie et de grandes sociétés pharmaceutiques explorent également son utilisation pour la découverte et le développement de médicaments.

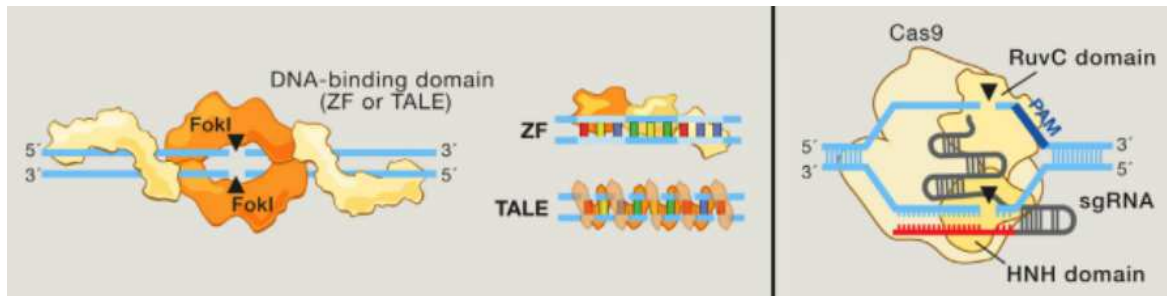
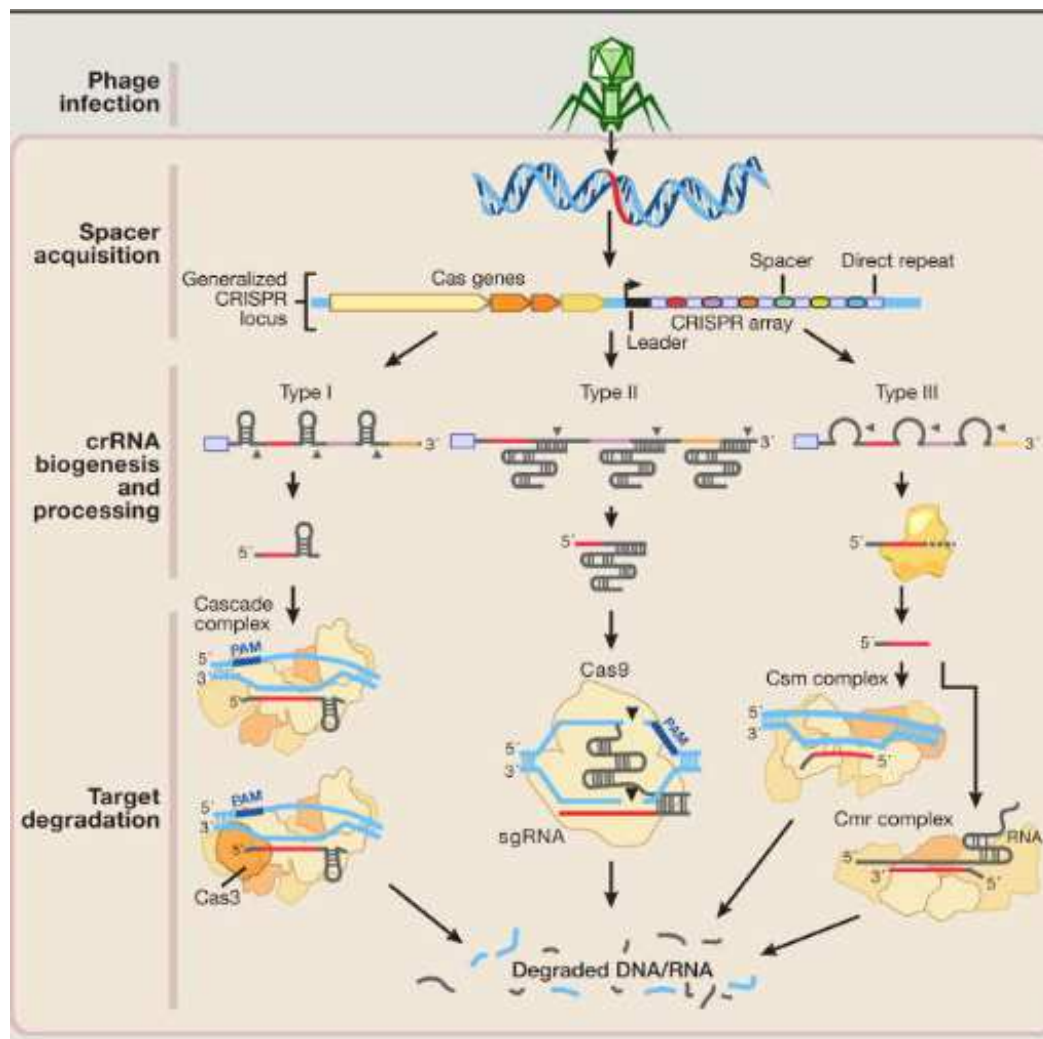


Figure 41 : Illustration des structures des nucléases : ZFNs, Talens et Crispr cas9[209]

6.4.1. Mécanisme d'action de système CRISPR Cas9

L'histoire de CRISPR en tant que système immunitaire étudié en microbiologie allait entrer en collision avec le domaine de l'édition génomique. Au fur et à mesure, l'accumulation des études sur le système CRISPR-Cas permit d'avoir une idée plus complète de son fonctionnement en tant que système immunitaire. C'est cette même base de connaissances qui permettrait aux scientifiques impliqués dans leurs découvertes d'identifier le potentiel qu'avait ce fantastique système naturel. Il pourrait être détourné de son activité initiale pour servir d'outil d'édition du génome et il avait le potentiel de faire partie des outils les plus performants de ce domaine (Figure 39)



6.4.1.1. CRISPR Cas9 comme système de défense immunitaire bactérien

Avant de quitter l'histoire microbiologique de CRISPR, pour nous intéresser seulement à l'ensemble formé par la protéine Cas9 et ses guides ARN, voici une description de l'action du système CRISPR-Cas9 en tant que système immunitaire adaptatif :

Le système CRISPR-Cas déclenche une immunité vis à vis d'éléments génétiques étrangers par le biais de 3 étapes : l'adaptation, l'expression et enfin l'interférence (**Figure 40**). Ces 3 étapes peuvent être réparties en deux groupes distincts : tout d'abord la « prise d'information » qui comprend l'étape d'adaptation puis « l'action » qui regroupe l'expression et l'interférence. Les protéines impliquées dans la prise d'information (Cas1 et Cas2) ont tendance à être hautement conservées entre les différents types CRISPR, tandis que celles des deux dernières

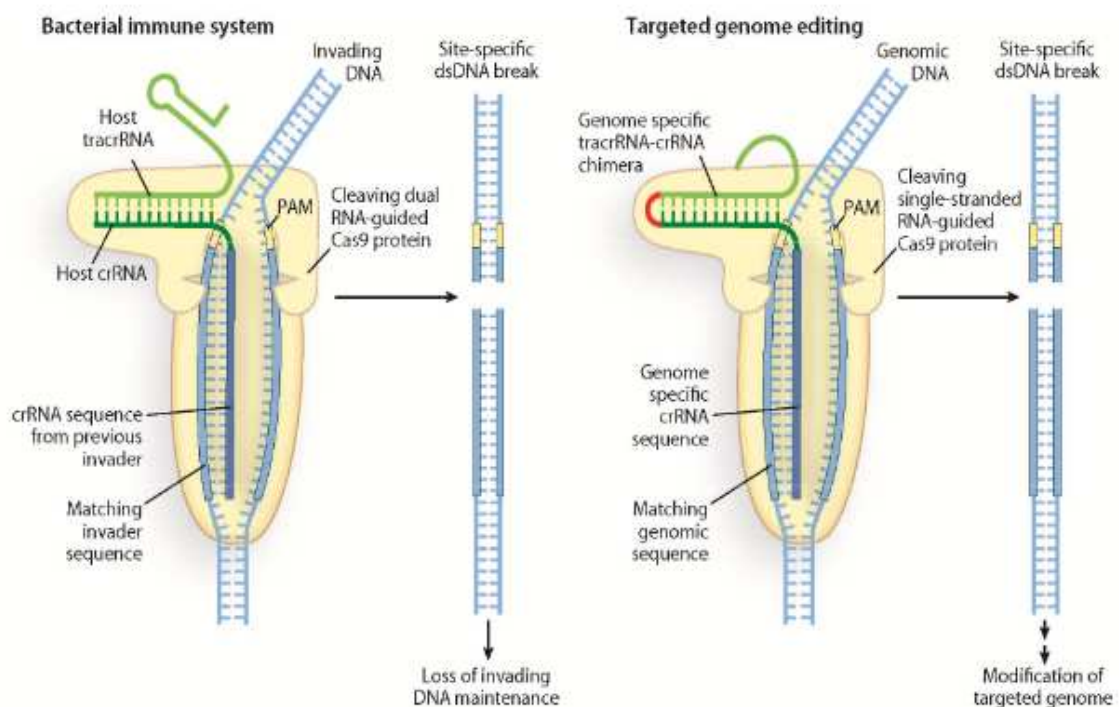


Figure 43 : Illustration du détournement du système immunitaire bactérien au profit de l'édition génomique

étapes varient grandement d'un micro-organisme à un autre.

[228]

6.4.1.2. CRISPR Cas9 comme outil de modification ciblée du génome

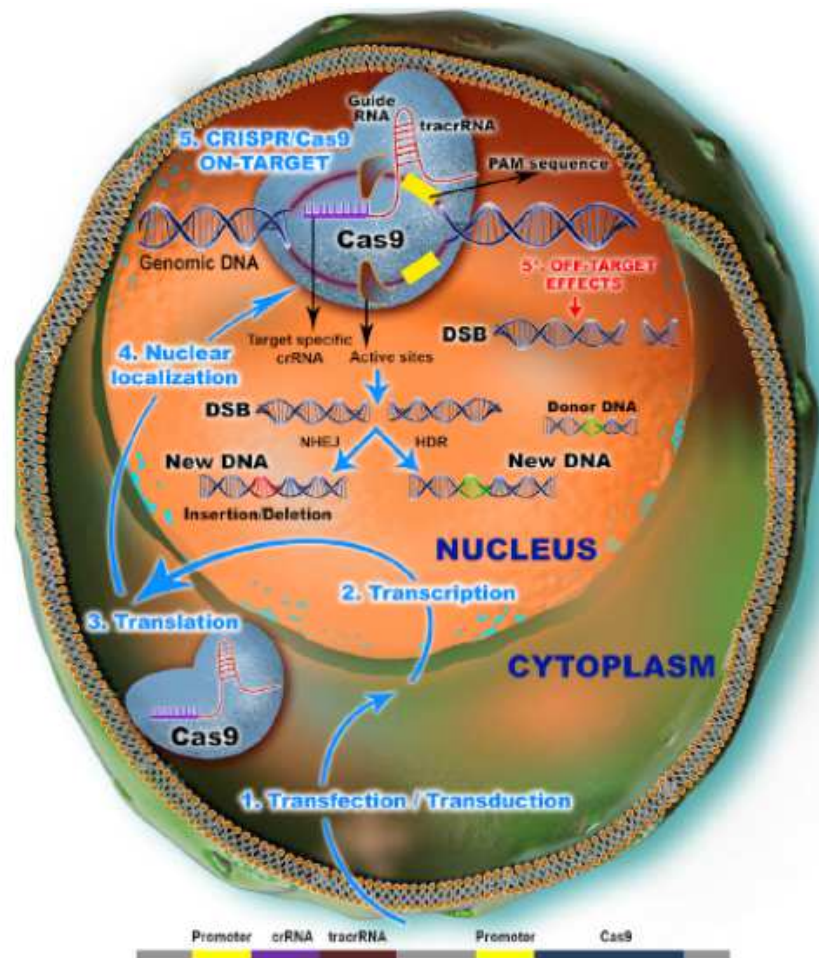


Figure 44 :Schéma illustrant le mécanisme d'action de système CRISPR Cas9

[229]

En microbiologie, CRISPR-Cas désigne la structure du génome qui supporte l'immunité adaptative de la bactérie. En biotechnologie c'est donc le même mot qui a été utilisé pour décrire la technique d'édition génomique par le duo composé de l'enzyme Cas9 et son guide d'ARN artificiel (soit le sgARN unique, soit le doublet tarcARN : crARN). La technologie CRISPR-Cas9 désigne donc la méthode qui permet d'éditer les cellules, tissus et organismes entiers de manière universelle : chez les plantes, animaux ou bactéries.

Les bactéries ont acquis les Cas9 pendant leur évolution. La Cas9 est l'endonucléase guidée par l'ARN des systèmes CRISPR de Type II. Cas9 peut aussi désigner les gènes Cas9 qui codent pour cette protéine. Bien que des protéines homologues existent, c'est aujourd'hui celle-ci qui apparaît la plus pratique car elle est capable d'agir seule par rapport à certains complexes protéiques qui remplissent le même rôle chez la bactérie. Elle est aussi de petite taille. La saCas9 de *Staphylococcus aureus* étant celle dont le rapport taille/spécificité semble le plus optimal [230]. Bien que de taille supérieure, la spCas9 de *Streptococcus pyogenes* est également largement répandue en laboratoire car elle fut adoptée la première [231].

Déroulement de l'action au niveau macromoléculaire (Figure 41)

Au contact de l'ADN double brin qu'elle va ensuite découper, la Cas9 reconnaît d'abord une séquence conservée de 2 à 4 paires de bases : le protospacer adjacent motif (PAM) (5'-NGG-3') [232]. Après fixation au PAM, la Cas9 interroge la séquence ADN opposée à celui-ci à la recherche d'une complémentarité avec l'ARN guide [233]. Si il y a complémentarité, avec les 12 premières bases (la séquence appelée seed), l'invasion de l'ARN peut avoir lieu en même temps que l'ADN se déroule pour former une boucle R (c'est à dire une boucle composée d'ADN simple brin formé par hybridation avec un ARN). S'ensuit un clivage précis de chaque brin par les domaines HNH et RuvC de la Cas9 qui génèrent une cassure double brin à bout franc. La cassure a lieu 3 nucléotides en amont de l'extrémité 3' de la séquence protospacer, en mesurant à partir du PAM [234]. L'ADN

nucléaire est balayé sous toutes les dimensions par le passage de la Cas9, ce qui entraîne un temps de passage différent en fonction des zones cibles et hors cible. Ce temps appelé le «differential binding residence time», qu'on peut traduire par « 97 durée du séjour au niveau des zones de liaison », est court pour les séquences hors-cible, et prolongé pour les séquences cibles. Ces trois mécanismes contribuent à la spécificité du ciblage des sites de clivage [235]

6.4.2. Approches d'édition génomique par le système CRISPR/Cas9

Les techniques d'édition génomique appliquées à la thérapie génique sont celles qui visent à éditer le génome de cellules humaines dans le but de réparer ou éliminer une mutation pathologique ou de conférer à ces cellules un avantage capable de participer à l'élimination d'une pathologie.

Pour ce faire, ces modifications doivent être apportées à un nombre suffisant de cellules pour inverser la situation pathogène, la modification apportée devra perdurer pendant toute l'existence de la pathologie sous-jacente. Dans le cas des maladies génétiques cela signifie que la mutation devra durer indéfiniment et être exprimée par les cellules modifiées mais également par leur descendance.

Deux approches cliniques sont envisageables : *in vivo* et *ex vivo* (**Figure 42**).

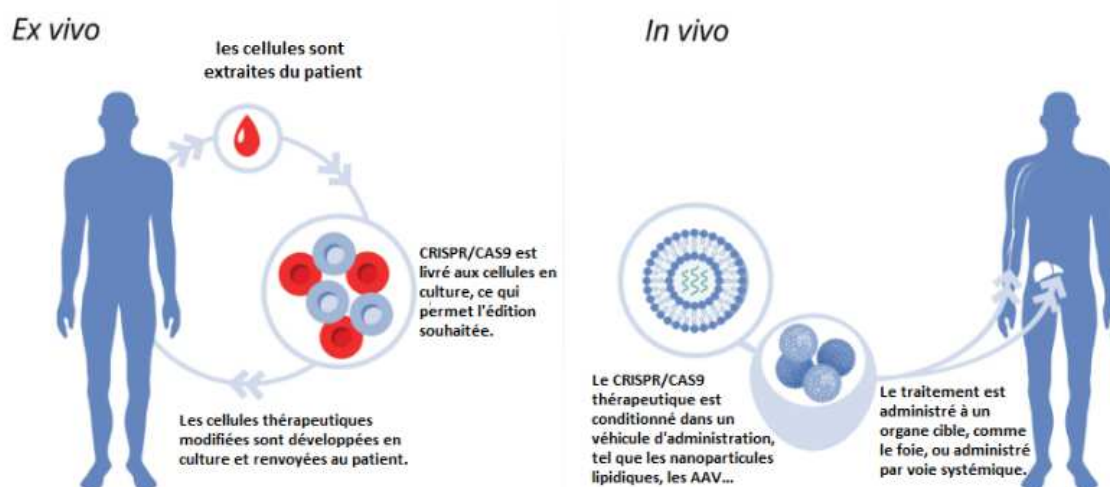


Figure 45 : Approches Ex Vivo vs. In Vivo
[236]

Pour l'édition génomique *ex vivo* les cellules du patient sont prélevées, éditées puis réintroduites. Pour que cette approche soit fructueuse, les cellules cibles doivent être capables de survivre hors du corps et de « nicher » à nouveau dans leurs tissus d'origine après transplantation.

L'approche *in vivo* implique l'édition génomique des cellules *in situ*. Pour la thérapie *in vivo* systémique, des vecteurs qui sont relativement indifférent de l'identité cellulaire ou de leur état doivent être utilisés pour permettre d'atteindre un large panel de types tissulaires. Par exemple la délivrance systémique d'AAV de type 9a été utilisée sur des modèles précliniques pour cibler le tissu hépatique avec une grande efficacité [237]. L'approche *in vivo* peut également être réalisée par injection locale des vecteurs viraux aux tissus souhaités, tels que l'œil, le cerveau ou les muscles.

Bien que présentant l'avantage de pouvoir cribler et sélectionner les cellules modifiées avant leur rinjection, l'approche *ex vivo* n'est pas applicable à toutes les maladies monogéniques. Plusieurs pathologies comme les myopathies ou la mucoviscidose nécessitent une modification *in vivo*.

Avant que l'édition génomique *in vivo* basée sur le système CRISPR puisse être appliquée chez l'homme dans des essais cliniques, des inconvénients pratiques et des défis techniques seront à surmonter. Tout d'abord définir et atteindre des objectifs de précision en matière de clivage et de réparation. Ensuite parvenir à une délivrance efficace en ciblant un type particulier de tissus, de cellules ou d'organes. Nous devons aussi comprendre comment contrôler les différentes voies physiologiques de réparation et définir de manière prédictible le devenir mutationnel de la réparation ADN après la création de cassures doubles brins.

Que ce soit pour l'édition *ex vivo* ou *in vivo*, les effets hors-cibles freinent les potentielles applications. Malgré l'adoption rapide de la Cas9 pour réaliser des perturbations génétiques et épigénétiques, et les progrès réalisés pour améliorer la spécificité de la protéine, nous connaissons encore mal son profil de liaison et de clivage hors-cible mais aussi ciblé. Comprendre la liaison de la Cas9 dans diverses situations d'accessibilité à la chromatine et les différents états épigénétiques permettra également une meilleure évaluation de son fonctionnement et permettra d'améliorer le choix des ARN guides. Les données générées par les études de ces liaisons permettront de compléter les modèles prédictifs et de minimiser l'activité hors-cible de la protéine, en thérapie génique ou pour d'autres applications qui requièrent un niveau élevé de précision [238].

L'édition génomique semble avoir un long chemin à parcourir avant de pouvoir transposer les preuves de concepts de thérapie génique en clinique.

6.5. Applications médicales de la technique CRISPR CAS9

L'une des technologies les plus révolutionnaires de ces dernières années dans le domaine de la biologie moléculaire est CRISPR-Cas9. La technologie CRISPR est un outil prometteur pour l'édition de gènes qui permet aux chercheurs de modifier facilement les séquences d'ADN et de modifier la fonction des gènes. Ses nombreuses applications potentielles comprennent la correction des défauts génétiques, le traitement et la prévention de la propagation des maladies.

- ▲ La technique d'édition de génome CRISPR-Cas9 montre que l'espoir de soigner des pathologies pensées incurables pourrait être à portée de main. Voici les exemples abordés :
 - ▲ En thérapie génique : l'application la plus évidente dans le cas des maladies monogéniques, et en cancérologie grâce à l'immunomodulation antitumorale.
 - ▲ En infectiologie :
 - L'éradication in vitro et in vivo de latences virales (par exemples: d'VHB, VIH).
 - Le développement d'antibactériens spécifiques dans un contexte d'émergence des bactéries multi-résistantes.
 - ▲ La génétique dirigée ou le forçage génétique «Gene drive», qui permettrait par exemple d'éradiquer les espèces d'anophèles disséminant le paludisme.
 - ▲ La xénotransplantation ou xénogreffe d'organes : c'est-à-dire des transplantations d'organes d'animaux chez des patients humains. La xénotransplantation vise à pallier une déficience d'organes, elle se penche sur le choix du cochon comme donneur privilégié.
 - ▲ En recherche fondamentale.

RESUMES

RESUME

AUTEUR : SAMINE Soufiane

TITRE : La médecine personnalisée entre thérapie ciblée et thérapie génique

Thèse de Doctorat en pharmacie

MOTS CLES : La médecine personnalisée, La thérapie ciblée, Inhibiteur de la tyrosine kinase, Anticorps monoclonaux, La thérapie génique, CRISPR-Cas9

La médecine personnalisée constitue une approche de la maladie et du soin centrée sur le patient, en fonction de ses caractéristiques biologiques, génétiques et épigénétiques individuelles. Elle englobe tous les stades de l'acte médical, du diagnostic moléculaire à l'aide de biomarqueurs, aux modalités thérapeutiques ciblées.

Les thérapies ciblées sont des médicaments dont l'action est dirigée plus spécifiquement vers les cellules tumorales que les chimiothérapies conventionnelles cytotoxiques, les thérapies ciblées agissent de façon très différente :

- Sur les voies de signalisation comme les inhibiteurs de tyrosine kinase, la première thérapie ciblée conçue comme telle dans la leucémie myéloïde chronique. L'imatinib est le premier des inhibiteurs disponibles pour cibler de nombreuses tyrosines kinases dans les leucémies et les lymphomes.
- Sur les antigènes de surfaces comme les anticorps monoclonaux dans les lymphomes ou les leucémies aiguës lymphoblastiques ; Rituximab a été un des premiers anticorps monoclonaux utilisés dans les lymphomes non hodgkinien en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle.

La thérapie génique est une biotechnologie qui utilise des acides nucléiques afin de traiter les maladies génétiques ou acquises. Elle consiste à insérer un ou des acides nucléiques dans les cellules d'un individu malade, via un vecteur. Ces acides nucléiques doivent permettre à la cellule de produire le médicament nécessaire à sa guérison. De nombreuses approches ont été développées à cette fin.

ABSTRACT

AUTHOR:SAMINE Soufiane

TITLE : Personalized medicine between targeted therapy and genetherapy

Ph.D. thesis in pharmacy

KEYWORDS : Personalized Medicine, Targeted Therapy, Tyrosine Kinase Inhibitor, Monoclonal antibodies, Gene Therapy, CRISPR-Cas9

Personalized medicine is an approach to illness and patient-centered care, based on its individual biological, genetic and epigenetic characteristics. It encompasses all stages of the medical procedure, from molecular diagnostics using biomarkers, to targeted therapeutic modalities.

Targeted therapies are drugs whose action is directed more specifically to ward tumor cells than conventional cytotoxic chemo therapies, targeted therapies act in a very different way:

- On signaling pathways such as tyrosine kinase inhibitors, the first targeted therapy designed as such in chronic myeloid leukemia. Imatinib is the first available inhibitor to target many tyrosine kinases in leukemias and lymphomas.
- Surface antigens such as monoclonal antibodies in lymphomas or acute lymphoblastic leukaemias; Rituximab was one of the first monoclonal antibodies used in non-Hodgkin's lymphoma in combination with conventional chemotherapy.

Gene therapy is a biotechnology that uses nucleic acids in order to treat genetic or acquired diseases. It consists of inserting via a vector one or more nucleic acids into the cells of a sick individual. These nucleic acids must allow the cell to produce the necessary drug for its healing. Many approaches have been developed for this purpose.

ملخص

الكاتب: سمين سفيان

العنوان: الطب الشخصي بين العلاج المستهدف والعلاج الجيني

أطروحة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الطب الشخصي، العلاج الموجه، مثبثات التيروسين كيناز ، العلاج الجيني، كريسبر-كاس-9

الطب الشخصي هو مقارنة للمرض وللرعاية التي تتمحور حول المريض، وذلك استنادا إلى خصائص المريض البيولوجية والوراثية والتخللية الفردية. ويشمل جميع مراحل الإجراء الطبي ، من التشخيص الجزيئي باستخدام المؤشرات الحيوية ، إلى الطرائق العلاجية المستهدفة. العلاجات المستهدفة هي العقاقير التي يتم توجيه عملها بشكل أكثر دقة نحو الخلايا السرطانية مقارنة بالعلاج الكيميائي التقليدي السام للخلايا ، حيث تعمل هاته العلاجات المستهدفة بطريقة مختلفة تماماً:

- على مستوى مسارات الإشارات مثل مثبثات التيروسين كيناز ، أول علاج مستهدف مصمم على هذا النحو في سرطان الدم النخاعي المزمن. يعتبر ايماتينيب هو المانع الأول المتاح لاستهداف العديد من كينازات التيروسين في اللوكيميا والأورام اللمفاوية.
- على مستوى المستضدات السطحية مثل الأجسام المضادة أحادية النسيلة في الأورام اللمفاوية أو اللوكيميا اللمفاوية الحادة. يُشكل ريتوكسيماب واحداً من أول الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المستخدمة في لمفوما اللاهودجكين بالاشتراك مع العلاج الكيميائي التقليدي .

العلاج الجيني هو تقنية حيوية تستخدم الأحماض النووية لعلاج الأمراض الوراثية أو المكتسبة. وتتمحور حول إدخال حمض نووي واحد أو أكثر في خلايا الفرد المريض عن طريق ناقل و يجب أن تسمح هذه الأحماض النووية للخلية بإنتاج الدواء اللازم لعلاجها، وقد تم تطوير العديد من المقاربات لهذا الغرض.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Physicians' Desk Reference, 54th Edition, Thompson Corporation, Toronto, 2000.*
2. Lazarou, J., B.H. Pomeranz, and P.N. Corey, *Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies.* *Jama*, 1998. **279**(15): p. 1200-1205.
3. Spear, B.B., M. Heath-Chiozzi, and J. Huff, *Clinical application of pharmacogenetics.* *Trends in molecular medicine*, 2001. **7**(5): p. 201-204.
4. Jain, K.K., *Role of biomarkers in personalized medicine*, in *Textbook of Personalized Medicine*. 2009, Springer. p. 59-68.
5. França, L.T., E. Carrilho, and T.B. Kist, *A review of DNA sequencing techniques.* *Quarterly reviews of biophysics*, 2002. **35**(2): p. 169-200.
6. Lamoril, J., et al., *Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. Première partie.* *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2008. **23**(5): p. 260-279.
7. Heather, J.M. and B. Chain, *The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA.* *Genomics*, 2016. **107**(1): p. 1-8.
8. Mullis, K., et al. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1986. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.* *Science*, 1995. **269**(5223): p. 496-512.
10. Kulski, J.K., *Next-Generation Sequencing—An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications*, in *Next Generation Sequencing-Advances, Applications and Challenges*. 2016, Intech.
11. Robert, J., *Polymorphismes génétiques.* *Bulletin du Cancer*, 2010. **97**(11): p. 1253-1264.

12. Shi, M.M., *Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies*. Clinical Chemistry, 2001. **47**(2): p. 164-172.
13. Edwards, Q.T. and A. Maradiegue, *Genetics and Genomics in Nursing: Guidelines for Conducting a Risk Assessment*. 2017: Springer Publishing Company.
14. Relton, C.L. and G. Davey Smith, *Is epidemiology ready for epigenetics?* International journal of epidemiology, 2012. **41**(1): p. 5-9.
15. Brouwer J.R. *A Crash Course in Epigenetics Part 1: An intro to epigenetics. Bitesize Bio*. Available from <https://bitesizebio.com/?s=epigenetic> consulté le 21 février 2018.
16. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457.
17. Holliday, R., *Epigenetics: a historical overview*. Epigenetics, 2006. **1**(2): p. 76-80.
18. Nebert, D.W. and E.S. Vesell, *Pharmacogenetics and pharmacogenomics*, in *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. 2013, Elsevier. p. 1-27.
19. LE GALL, J.-Y., *Techniques d'analyse du génome et de son expression: applications médicales*. Bulletin de l'Académie nationale de médecine, 2012. **196**(1): p. 151-171.
20. Baselga, J., et al., *Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor–Positive Advanced Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(6): p. 520-529.
21. *EVOLUTION DES METHODES DE GENOTYPAGE - Scientific Figure on ResearchGate*. Available from: https://www.researchgate.net/Principe-du-pyrosequencage_fig4_230690734 [accessed 6 Oct, 2018].
22. Koboldt, D.C., et al., *The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics*. Cell, 2013. **155**(1): p. 27-38.
23. Lu, H., F. Giordano, and Z. Ning, *Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly*. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2016. **14**(5): p. 265-279.

24. Branton, D., et al., *The potential and challenges of nanopore sequencing*, in *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*. 2010, World Scientific. p. 261-268.
25. Deamer, D., M. Akeson, and D. Branton, *Three decades of nanopore sequencing*. *Nature biotechnology*, 2016. **34**(5): p. 518.
26. Benner, S., et al., *Sequence-specific detection of individual DNA polymerase complexes in real time using a nanopore*. *Nature nanotechnology*, 2007. **2**(11): p. 718.
27. Dr Laurent Alexandre Président de DNAVision, audition publique du 27 mars 2013. Disponible en ligne sur : <<http://www.senat.fr/notice-rapport/2013/r13-306-notice.html>> (Consulté le 06/10/2018).
28. Pr Florent Soubrier Responsable du département de génétique du groupe hospitalier de La Pitié Salpêtrière-Charles Foix - Audition publique du 27 mars 2013. Disponible en ligne sur : <<http://www.senat.fr/notice-rapport/2013/r13-306-notice.html>> (Consulté le 06/10/2018).
29. Reboud, J., *Mise au point d'un format innovant de puces à cellules pour l'analyse phénotypique à haut-contenu*. 2006, Grenoble 1.
30. Roche. *Caractéristiques techniques de la puce AmpliChip CYP 450*. Disponible en Ligne sur : <<http://molecular.roche.com/assays/Pages/AmpliChipCYP450Test.aspx>> (Consulté le 06/10/2018).
31. Marquet, P., et al., *Recherche translationnelle: médecine personnalisée, médecine de précision, thérapies ciblées: marketing ou science?* *Thérapie*, 2015. **70**(1): p. 1-10.
32. Hantraye, B. and N. Clere, *Les anticorps monoclonaux*. *Actualités Pharmaceutiques*, 2015. **54**(551): p. 18-21.
33. Weiner, L.M. and R. Surana, *50 - Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer*, in *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, J. Mendelsohn, et al., Editors. 2015, Content Repository Only!: Philadelphia. p. 683-694.e3.
34. Paintaud, G., et al., *Les anticorps monoclonaux: une avancée thérapeutique récente et majeure*. *Thérapie*, 2009. **64**(1): p. 1-7.

35. Villamor, N., E. Montserrat, and D. Colomer. *Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy*. in *Seminars in oncology*. 2003. Elsevier.
36. Natoli, C., et al., *Tyrosine kinase inhibitors*. *Current cancer drug targets*, 2010. **10**(5): p. 462-483.
37. Hantraye, B., A. Leroux, and N. Clere, *Les inhibiteurs de tyrosine kinase*. *Actualités Pharmaceutiques*, 2015. **54**(551): p. 22-27.
38. Boschelli, F., K. Arndt, and C. Gambacorti-Passerini, *Bosutinib: a review of preclinical studies in chronic myelogenous leukaemia*. *European Journal of Cancer*, 2010. **46**(10): p. 1781-1789.
39. Soverini, S., et al., *Bcr-Abl kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet*. *Blood*, 2011: p. blood-2010-12-326405.
40. Chong, C.R. and P.A. Jänne, *The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer*. *Nature medicine*, 2013. **19**(11): p. 1389.
41. Leduc, C. and B. Besse, *Targeted therapies in non-small cell lung cancer in 2014*. *Revue des maladies respiratoires*, 2015. **32**(2): p. 182-192.
42. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. *New England Journal of Medicine*, 2011. **364**(26): p. 2507-2516.
43. Sosman, J.A., et al., *Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib*. *New England Journal of Medicine*, 2012. **366**(8): p. 707-714.
44. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. *The Lancet*, 2012. **380**(9839): p. 358-365.
45. Blackhall, F., et al., *The impact on the multidisciplinary team of molecular profiling for personalized therapy in non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2013. **79**(2): p. 101-103.

46. Motzer, R.J., et al., *Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma*. Journal of clinical oncology, 2009. **27**(22): p. 3584.
47. Stein, A., W. Voigt, and K. Jordan, *Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management*. Therapeutic advances in medical oncology, 2010. **2**(1): p. 51-63.
48. Edmonds, K., et al., *Strategies for assessing and managing the adverse events of sorafenib and other targeted therapies in the treatment of renal cell and hepatocellular carcinoma: recommendations from a European nursing task group*. European Journal of Oncology Nursing, 2012. **16**(2): p. 172-184.
49. Flaherty, K.T., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(18): p. 1694-1703.
50. Mauro, M.J. and M.W. Deininger, *Management of drug toxicities in chronic myeloid leukaemia*. Best practice & research clinical haematology, 2009. **22**(3): p. 409-429.
51. Preudhomme, C., et al., *Recommandations du groupe FI-LMC pour la prise en charge des patients présentant des mutations du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL dans les hémopathies malignes à chromosome Philadelphie*. Hématologie, 2010. **16**(1): p. 65-79.
52. Jin, H.-O., et al., *Piperlongumine downregulates the expression of HER family in breast cancer cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2017. **486**(4): p. 1083-1089.
53. Şen, E., İ. Öner, and Ö. Ata, *Imatinib and hypophosphatemia: Case report and review of literature*. Journal of Oncological Sciences, 2017. **3**(2): p. 92-95.
54. Friederichs, J., et al., *Immunohistochemical detection of receptor tyrosine kinases c-kit, EGF-R, and PDGF-R in colorectal adenocarcinomas*. Langenbeck's archives of surgery, 2010. **395**(4): p. 373-379.
55. Kang, H., et al., *Magnobovatol inhibits smooth muscle cell migration by suppressing PDGF-R β phosphorylation and inhibiting matrix metalloproteinase-2 expression*. International journal of molecular medicine, 2016. **37**(5): p. 1239-1246.

56. Hallberg, B. and R. Palmer, *The role of the ALK receptor in cancer biology*. Annals of Oncology, 2016. **27**(suppl_3): p. iii4-iii15.
57. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies*. Genes & cancer, 2011. **2**(12): p. 1097-1105.
58. Clayton, P.E., et al., *Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk*. Nature Reviews Endocrinology, 2010. **7**(1): p. nrendo. 2010.171.
59. Anisimov, V.N. and A. Bartke, *The key role of growth hormone–insulin–IGF-1 signaling in aging and cancer*. Critical reviews in oncology/hematology, 2013. **87**(3): p. 201-223.
60. Graveel, C.R., D. Tolbert, and G.F.V. Woude, *MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013. **5**(7): p. a009209.
61. Wang, J., et al., *Fluorine in pharmaceutical industry: fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001–2011)*. Chemical reviews, 2013. **114**(4): p. 2432-2506.
62. Dienstmann, R., et al., *Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors*. Molecular cancer therapeutics, 2014.
63. Courtney, K.D., R.B. Corcoran, and J.A. Engelman, *The PI3K pathway as drug target in human cancer*. Journal of clinical oncology, 2010. **28**(6): p. 1075.
64. Agoulnik, I.U., et al., *INPP4B: the new kid on the PI3K block*. Oncotarget, 2011. **2**(4): p. 321.
65. Sun, T., et al., *Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase*. Cell, 2011. **144**(5): p. 703-718.
66. LoRusso, P.M., *Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in solid tumors*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(31): p. 3803-3815.
67. Knight, Z. and K. Shokat, *Chemically targeting the PI3K family*. 2007, Portland Press Limited.
68. Marone, R., et al., *Targeting phosphoinositide 3-kinase—moving towards therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008. **1784**(1): p. 159-185.

69. Knight, Z.A., et al., *A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling*. Cell, 2006. **125**(4): p. 733-747.
70. Fan, Q.-W., et al., *A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma*. Cancer cell, 2006. **9**(5): p. 341-349.
71. Maira, S.-M., et al., *Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity*. Molecular cancer therapeutics, 2008. **7**(7): p. 1851-1863.
72. Garlich, J.R., et al., *A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity*. Cancer research, 2008. **68**(1): p. 206-215.
73. Ihle, N.T., et al., *The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts*. Molecular cancer therapeutics, 2005. **4**(9): p. 1349-1357.
74. Hilgard, P., et al., *D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity*. European journal of cancer, 1997. **33**(3): p. 442-446.
75. Meuillet, E.J., et al., *In vivo molecular pharmacology and antitumor activity of the targeted Akt inhibitor PX-316*. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2004. **14**(10): p. 513-527.
76. Gills, J.J., et al., *Spectrum of activity and molecular correlates of response to phosphatidylinositol ether lipid analogues, novel lipid-based inhibitors of Akt*. Molecular cancer therapeutics, 2006. **5**(3): p. 713-722.
77. Rhodes, N., et al., *Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity*. Cancer research, 2008. **68**(7): p. 2366-2374.
78. Yang, H., et al., *MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN*. Cancer research, 2008. **68**(2): p. 425-433.
79. Vezina, C., A. Kudelski, and S. Sehgal, *Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic*. The Journal of antibiotics, 1975. **28**(10): p. 721-726.

80. Yatscoff, R.W., D.F. LeGatt, and N.M. Kneteman, *Therapeutic monitoring of rapamycin: a new immunosuppressive drug*. Therapeutic drug monitoring, 1993. **15**(6): p. 478-482.
81. Faivre, S., G. Kroemer, and E. Raymond, *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents*. Nature reviews Drug discovery, 2006. **5**(8): p. 671.
82. Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer*. Cancer cell, 2007. **12**(1): p. 9-22.
83. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer*. Cancer cell, 2005. **8**(3): p. 179-183.
84. Trump, D.L. *Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma*. Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, Park Y, Liou SH, Marshall B, Boni JP, Dukart G, Sherman ML, Department of Medicine, Division of Hematology/Oncology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA.: *J Clin Oncol* 2004; 22: 909–18. in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2004. Elsevier.
85. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
86. Guertin, D.A., et al., *mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice*. Cancer cell, 2009. **15**(2): p. 148-159.
87. Méjean, A. and T. Lebreton, *Cibles, voies et molécules*. Progrès en Urologie, 2008. **18**: p. S173-S177.
88. Fiskus, W. and N. Mitsiades, *B-Raf inhibition in the clinic: present and future*. Annual review of medicine, 2016. **67**: p. 29-43.
89. Cheng, Y. and H. Tian, *Current development status of MEK inhibitors*. Molecules, 2017. **22**(10): p. 1551.
90. Ohori, M., et al., *Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **336**(1): p. 357-363.

91. Kinoshita, T., et al., *Crystal structure of human ERK2 complexed with a pyrazolo [3, 4-c] pyridazine derivative*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2006. **16**(1): p. 55-58.
92. Aronov, A.M., et al., *Structure-guided design of potent and selective pyrimidylpyrrole inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERK) using conformational control*. Journal of medicinal chemistry, 2009. **52**(20): p. 6362-6368.
93. Park, H., et al., *Identification of novel inhibitors of extracellular signal-regulated kinase 2 based on the structure-based virtual screening*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008. **18**(20): p. 5372-5376.
94. Mebratu, Y. and Y. Tesfaigzi, *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?* Cell cycle, 2009. **8**(8): p. 1168-1175.
95. Hagemann, C. and U.R. Rapp, *Isotype-specific functions of Raf kinases*. Experimental cell research, 1999. **253**(1): p. 34-46.
96. Khazak, V., et al., *Selective Raf inhibition in cancer therapy*. Expert opinion on therapeutic targets, 2007. **11**(12): p. 1587-1609.
97. Beeram, M., A. Patnaik, and E.K. Rowinsky, *Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer*. Journal of clinical oncology, 2005. **23**(27): p. 6771-6790.
98. Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais, *The RAF proteins take centre stage*. Nature reviews Molecular cell biology, 2004. **5**(11): p. 875.
99. Gollob, J.A., et al. *Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway*. in *Seminars in oncology*. 2006. Elsevier.
100. Manasanch, E.E. and R.Z. Orlowski, *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy*. Nature reviews. Clinical oncology, 2017. **14**(7): p. 417-433.
101. Meyerson, M., et al., *A family of human cdc2-related protein kinases*. The EMBO journal, 1992. **11**(8): p. 2909-2917.
102. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-1677.

103. Shapiro, G.I. and J.W. Harper, *Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(12): p. 1645-1653.
104. Orzáez, M., et al., *ATP-Noncompetitive Inhibitors of CDK–Cyclin Complexes*. ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery, 2009. **4**(1): p. 19-24.
105. Malumbres, M., et al., *CDK inhibitors in cancer therapy: what is next?* Trends in pharmacological sciences, 2008. **29**(1): p. 16-21.
106. Descamps, S. and C. Prigent, *Aurora-A,-B et-C: À l'aube d'une nouvelle connexion entre l'amplification des centrosomes, l'aneuploïdie et le cancer?* médecine/sciences, 2002. **18**(4): p. 474-480.
107. Carvajal, R.D., A. Tse, and G.K. Schwartz, *Aurora kinases: new targets for cancer therapy*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(23): p. 6869-6875.
108. Zhou, H., et al., *Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation*. Nature genetics, 1998. **20**(2): p. 189.
109. Bischoff, J.R., et al., *A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers*. The EMBO journal, 1998. **17**(11): p. 3052-3065.
110. Wilkinson, R.W., et al., *AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis*. Clinical cancer research, 2007. **13**(12): p. 3682-3688.
111. Tyler, R.K., et al., *VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells*. Cell cycle, 2007. **6**(22): p. 2846-2854.
112. Dood, R.L., et al., *When Ovarian Cancer Is Not: Characterizing Nonovarian Cancer Pathology in a Laparoscopy-Based Triage System*. International Journal of Gynecological Cancer, 2018. **28**(8): p. 1485-1490.
113. Minchenko, A., et al., *Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1994. **71**(3): p. 374-379.
114. Marco, S., et al., *Traitements antiangiogéniques en oncologie thoracique: succès, échecs et perspectives*. Revue des Maladies Respiratoires, 2011. **28**(10): p. 1216-1229.

115. Ranieri, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic*. Current medicinal chemistry, 2006. **13**(16): p. 1845-1857.
116. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. Cancer research, 2004. **64**(19): p. 7099-7109.
117. Osusky, K.L., et al., *The receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248 impedes endothelial cell migration, tubule formation, and blood vessel formation in vivo, but has little effect on existing tumor vessels*. Angiogenesis, 2004. **7**(3): p. 225-233.
118. Jin, H. and J. Varner, *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. British journal of cancer, 2004. **90**(3): p. 561.
119. Ramakrishnan, V., et al., *Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent*. Journal of experimental therapeutics & oncology, 2006. **5**(4).
120. Hariharan, S., et al., *Assessment of the biological and pharmacological effects of the $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrin receptor antagonist, cilengitide (EMD 121974), in patients with advanced solid tumors*. Annals of oncology, 2007. **18**(8): p. 1400-1407.
121. Jia, L.-T., S.-Y. Chen, and A.-G. Yang, *Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery*. Cancer treatment reviews, 2012. **38**(7): p. 868-876.
122. *Pr Bertrand Jordan Biologiste moléculaire, fondateur de la Génomique de Marseille -Audition des rapporteurs du 12 février 2013 Disponible en ligne sur : <<http://www.senat.fr/notice-rapport/2013/r13-306-notice.html>> (Consulté le 16/10/2018)*.
123. Kitson, F.G., B.S. Larsen, and C.N. McEwen, *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. 1996: Academic Press.
124. Gilgenkrantz, S., *Thérapie génique Espoir ou illusion? Bertrand Jordan*. médecine/sciences, 2007. **23**(2): p. 221-222.
125. Porteus, M.H., *Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing*. Genome biology, 2015. **16**(1): p. 286.

126. Evens, R. and K. Kaitin, *The evolution of biotechnology and its impact on health care*. Health Affairs, 2015. **34**(2): p. 210-219.
127. Scheller, E. and P. Krebsbach, *Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration*. Journal of dental research, 2009. **88**(7): p. 585-596.
128. Gonçalves, G.A.R. and R.d.M.A. Paiva, *Gene therapy: advances, challenges and perspectives*. Einstein (São Paulo), 2017. **15**(3): p. 369-375.
129. Kahn, A. and D. Briand, *Thérapie génique: espoirs et limites*. 1991.
130. Hood, L. and L. Rowen, *The human genome project: big science transforms biology and medicine*. Genome medicine, 2013. **5**(9): p. 79.
131. Pessach, I.M. and L.D. Notarangelo, *Gene therapy for primary immunodeficiencies: looking ahead, toward gene correction*. Journal of allergy and clinical immunology, 2011. **127**(6): p. 1344-1350.
132. Pérez-Luz, S. and J. Díaz-Nido, *Prospects for the use of artificial chromosomes and minichromosome-like episomes in gene therapy*. BioMed Research International, 2010. **2010**.
133. Sargent, R.G., S. Kim, and D.C. Gruenert, *Oligo/polynucleotide-based gene modification: strategies and therapeutic potential*. Oligonucleotides, 2011. **21**(2): p. 55-75.
134. Valton, J., et al., *Efficient strategies for TALEN-mediated genome editing in mammalian cell lines*. Methods, 2014. **69**(2): p. 151-170.
135. Takasu, Y., et al., *Efficient TALEN construction for Bombyx mori gene targeting*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73458.
136. Holkers, M., et al., *Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells*. Nucleic acids research, 2012. **41**(5): p. e63-e63.
137. Richter, C., J.T. Chang, and P.C. Fineran, *Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems*. Viruses, 2012. **4**(10): p. 2291-2311.
138. Bondy-Denomy, J. and A.R. Davidson, *To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR–Cas systems*. Trends in microbiology, 2014. **22**(4): p. 218-225.

139. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121): p. 823-826.
140. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. nature, 1998. **391**(6669): p. 806.
141. Lim, L.P., et al., *The microRNAs of *Caenorhabditis elegans**. Genes & development, 2003. **17**(8): p. 991-1008.
142. Marquez, R.T. and A.P. McCaffrey, *Advances in microRNAs: implications for gene therapists*. Human gene therapy, 2008. **19**(1): p. 27-38.
143. Arbuthnot, P. and L.J. Thompson, *Harnessing the RNA interference pathway to advance treatment and prevention of hepatocellular carcinoma*. World journal of gastroenterology: WJG, 2008. **14**(11): p. 1670.
144. Chang, A.L., J.J. Wolf, and C.D. Smolke, *Synthetic RNA switches as a tool for temporal and spatial control over gene expression*. Current opinion in biotechnology, 2012. **23**(5): p. 679-688.
145. Li, Z. and T.M. Rana, *Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries*. Accounts of chemical research, 2012. **45**(7): p. 1122-1131.
146. Brown, B.D., et al., *A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4144-4152.
147. Sullivan, J.M., et al., *Variables and strategies in development of therapeutic post-transcriptional gene silencing agents*. Journal of ophthalmology, 2011. **2011**.
148. Barar, J. and Y. Omid, *Translational approaches towards cancer gene therapy: hurdles and hopes*. BioImpacts: BI, 2012. **2**(3): p. 127.
149. Lin, J., et al., *Stabilization of G-quadruplex DNA by C-5-methyl-cytosine in *bcl-2* promoter: implications for epigenetic regulation*. Biochemical and biophysical research communications, 2013. **433**(4): p. 368-373.
150. Ghosal, G. and K. Muniyappa, *Hoogsteen base-pairing revisited: resolving a role in normal biological processes and human diseases*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **343**(1): p. 1-7.
151. Rodríguez, L., et al., *Polypurine reverse Hoogsteen hairpins as a gene therapy tool against survivin in human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo*. Biochemical pharmacology, 2013. **86**(11): p. 1541-1554.

152. Papanikolaou, E., et al., *The new self-inactivating lentiviral vector for thalassemia gene therapy combining two HPFH activating elements corrects human thalassemic hematopoietic stem cells*. Human gene therapy, 2011. **23**(1): p. 15-31.
153. Dietz, H.C., *New therapeutic approaches to mendelian disorders*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(9): p. 852-863.
154. Nayerossadat, N., T. Maedeh, and P.A. Ali, *Viral and nonviral delivery systems for gene delivery*. Advanced biomedical research, 2012. **1**.
155. Naidoo, J. and D. Young, *Gene regulation systems for gene therapy applications in the central nervous system*. Neurology research international, 2012. **2012**.
156. Kaufmann, K.B., et al., *Gene therapy on the move*. EMBO molecular medicine, 2013. **5**(11): p. 1642-1661.
157. Manjila, S.B., et al., *Novel gene delivery systems*. International journal of pharmaceutical investigation, 2013. **3**(1): p. 1.
158. Sharma, A., et al., *Adenovirus receptors and their implications in gene delivery*. Virus research, 2009. **143**(2): p. 184-194.
159. Coughlan, L., et al., *Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors*. Viruses, 2010. **2**(10): p. 2290-2355.
160. Kamimura, K., et al., *Advances in gene delivery systems*. Pharmaceutical medicine, 2011. **25**(5): p. 293-306.
161. Lentz, T.B., S.J. Gray, and R.J. Samulski, *Viral vectors for gene delivery to the central nervous system*. Neurobiology of disease, 2012. **48**(2): p. 179-188.
162. Li, H., et al., *Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model*. Blood, 2011. **117**(12): p. 3311-3319.
163. Zhong, L., et al., *Development of novel recombinant AAV vectors and strategies for the potential gene therapy of hemophilia*. Journal of genetic syndrome & gene therapy, 2012.
164. Boutin, S., et al., *Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors*. Human gene therapy, 2010. **21**(6): p. 704-712.

165. Sen, D., et al., *Improved adeno-associated virus (AAV) serotype 1 and 5 vectors for gene therapy*. Scientific reports, 2013. **3**: p. 1832.
166. Spencer, T.E. and M. Palmarini, *Application of next generation sequencing in mammalian embryogenomics: lessons learned from endogenous betaretroviruses of sheep*. Animal reproduction science, 2012. **134**(1-2): p. 95-103.
167. Cronin, J., X.-Y. Zhang, and J. Reiser, *Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping*. Current gene therapy, 2005. **5**(4): p. 387-398.
168. Escors, D. and K. Breckpot, *Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential*. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 2010. **58**(2): p. 107-119.
169. Dufait, I., et al., *Retroviral and lentiviral vectors for the induction of immunological tolerance*. Scientifica, 2012. **2012**.
170. Green, J.J., *2011 Rita Schaffer lecture: nanoparticles for intracellular nucleic acid delivery*. Annals of biomedical engineering, 2012. **40**(7): p. 1408-1418.
171. Kong, F., et al., *Mannosylated liposomes for targeted gene delivery*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 1079.
172. Sarker, S.R., et al., *Arginine-based cationic liposomes for efficient in vitro plasmid DNA delivery with low cytotoxicity*. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 1361.
173. Miele, E., et al., *Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 3637.
174. Lv, H., et al., *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery*. Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 100-109.
175. Lee, Y., et al., *Human erythropoietin gene delivery using an arginine-grafted bioreducible polymer system*. Molecular Therapy, 2012. **20**(7): p. 1360-1366.
176. Zhang, Y., A. Satterlee, and L. Huang, *In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles?* Molecular therapy, 2012. **20**(7): p. 1298-1304.
177. Xu, J., E. Feng, and J. Song, *Renaissance of aliphatic polycarbonates: New techniques and biomedical applications*. Journal of applied polymer science, 2014. **131**(5).

178. Mao, S., W. Sun, and T. Kissel, *Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA*. Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(1): p. 12-27.
179. Elzoghby, A.O., *Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research*. Journal of Controlled Release, 2013. **172**(3): p. 1075-1091.
180. Huang, Y.-P., et al., *Delivery of small interfering RNAs in human cervical cancer cells by polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes*. Nanoscale research letters, 2013. **8**(1): p. 267.
181. Bates, K. and K. Kostarelos, *Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: past achievements, present challenges and future goals*. Advanced drug delivery reviews, 2013. **65**(15): p. 2023-2033.
182. Mandeville, J.-S., et al., *Biogenic and synthetic polyamines bind cationic dendrimers*. PloS one, 2012. **7**(4): p. e36087.
183. Nam, H.Y., et al., *Biodegradable PAMAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity*. Biomaterials, 2009. **30**(4): p. 665-673.
184. Cao, X., et al., *Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency*. International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 3335.
185. Pissuwan, D., T. Niidome, and M.B. Cortie, *The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems*. Journal of controlled release, 2011. **149**(1): p. 65-71.
186. Ladewig, K., et al., *Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1821-1829.
187. Yan, S., et al., *High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA*. Journal of controlled release, 2012. **161**(3): p. 763-771.
188. Herweijer, H. and J. Wolff, *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy*. Gene therapy, 2003. **10**(6): p. 453.
189. Wolff, J.A. and V. Budker, *The mechanism of naked DNA uptake and expression*. Advances in genetics, 2005. **54**: p. 1-20.

190. Bonamassa, B., L. Hai, and D. Liu, *Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research*. Pharmaceutical research, 2011. **28**(4): p. 694-701.
191. Cukjati, D., et al., *Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy*. Bioelectrochemistry, 2007. **70**(2): p. 501-507.
192. Gresch, O., et al., *New non-viral method for gene transfer into primary cells*. Methods, 2004. **33**(2): p. 151-163.
193. Lentacker, I., et al., *Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms*. Advanced drug delivery reviews, 2014. **72**: p. 49-64.
194. Li, C., L. Li, and A.C. Keates, *Targeting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles*. Oncotarget, 2012. **3**(4): p. 365.
195. Zheng, S., et al., *Preparation and characterization of magnetic gene vectors for targeting gene delivery*. Applied Surface Science, 2012. **259**: p. 201-207.
196. Wang, C., et al., *Dual-purpose magnetic micelles for MRI and gene delivery*. Journal of Controlled Release, 2012. **163**(1): p. 82-92.
197. Mannell, H., et al., *Site directed vascular gene delivery in vivo by ultrasonic destruction of magnetic nanoparticle coated microbubbles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(8): p. 1309-1318.
198. Plank, C., O. Zelphati, and O. Mykhaylyk, *Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(14-15): p. 1300-1331.
199. Skipper, K.A., et al., *DNA transposon-based gene vehicles-scenes from an evolutionary drive*. Journal of biomedical science, 2013. **20**(1): p. 92.
200. Jung, S., et al., *Sleeping Beauty transposon system harboring HRAS, c-Myc and shp53 induces sarcomatoid carcinomas in mouse skin*. Oncology reports, 2013. **29**(4): p. 1293-1298.
201. Field, A.-C., et al., *Comparison of lentiviral and sleeping beauty mediated $\alpha\beta$ T cell receptor gene transfer*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e68201.
202. Ni, X., et al., *Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons*. Current medicinal chemistry, 2011. **18**(27): p. 4206-4214.

203. Kotula, J.W., et al., *Aptamer-mediated delivery of splice-switching oligonucleotides to the nuclei of cancer cells*. *Nucleic acid therapeutics*, 2012. **22**(3): p. 187-195.
204. Fischer, A., S. Hacein-Bey-Abina, and M. Cavazzana-Calvo, *Gene therapy of primary T cell immunodeficiencies*. *Gene*, 2013. **525**(2): p. 170-173.
205. Maeder, M.L. and C.A. Gersbach, *Genome-editing technologies for gene and cell therapy*. *Molecular Therapy*, 2016. **24**(3): p. 430-446.
206. *U S Food and Drug Administration: Information About Self-Administration of Gene Therapy*: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ucm586343.htm> consulté le 04 décembre 2017.
207. Editing, H.G., *Science, Ethics, and Governance*. National Academy Of Sciences, Engineering, Medicine report available at: <https://www.nap.edu/catalog/24623/human-genome-editingscience-ethics-and-governance>, 2017.
208. Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang, *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. *Cell*, 2014. **157**(6): p. 1262-1278.
209. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas III, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. *Trends in biotechnology*, 2013. **31**(7): p. 397-405.
210. Kuscu, C., et al., *Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease*. *Nature biotechnology*, 2014. **32**(7): p. 677.
211. Rothkamm, K., et al., *Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle*. *Molecular and cellular biology*, 2003. **23**(16): p. 5706-5715.
212. Shalem, O., et al., *Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells*. *Science*, 2014. **343**(6166): p. 84-87.
213. Maruyama, T., et al., *Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining*. *Nature biotechnology*, 2015. **33**(5): p. 538.
214. Suzuki, K., et al., *In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration*. *Nature*, 2016. **540**(7631): p. 144.

215. Yu, C., et al., *Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells*. Cell stem cell, 2015. **16**(2): p. 142-147.
216. Decottignies, A., *Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective*. Frontiers in genetics, 2013. **4**: p. 48.
217. Lenhart, J.S., et al., *DNA repair and genome maintenance in Bacillus subtilis*. Microbiology and molecular biology reviews, 2012. **76**(3): p. 530-564.
218. Bennardo, N., et al., *Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair*. PLoS genetics, 2008. **4**(6): p. e1000110.
219. Sakuma, T., et al., *Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system*. Scientific reports, 2014. **4**: p. 5400.
220. Jasin, M. and R. Rothstein, *Repair of strand breaks by homologous recombination*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013: p. a012740.
221. Bibikova, M., et al., *Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(1): p. 289-297.
222. Porteus, M.H. and D. Baltimore, *Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells*. Science, 2003. **300**(5620): p. 763-763.
223. Bibikova, M., et al., *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. Science, 2003. **300**(5620): p. 764-764.
224. Urnov, F.D., et al., *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 646.
225. Urnov, F.D., et al., *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(9): p. 636.
226. Moscou, M.J. and A.J. Bogdanove, *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors*. Science, 2009. **326**(5959): p. 1501-1501.
227. Boch, J., et al., *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors*. Science, 2009. **326**(5959): p. 1509-1512.
228. Yarris, L. *Programmable DNA Scissors Found for Bacterial Immune System | Berkeley Lab. News Center (2012). Disponible sur: <http://newscenter.lbl.gov/2012/06/28/programmable-dna-scissors/>. Consulté le 30 Octobre 2018.*

229. Chira, S., et al., *CRISPR/Cas9: transcending the reality of genome editing*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2017. **7**: p. 211-222.
230. Wang, Y., et al., *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew*. Nature biotechnology, 2014. **32**(9): p. 947.
231. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012: p. 1225829.
232. Anders, C., et al., *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease*. Nature, 2014. **513**(7519): p. 569.
233. Sternberg, S.H., et al., *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9*. Nature, 2014. **507**(7490): p. 62.
234. Szczelkun, M.D., et al., *Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(27): p. 9798-9803.
235. Sternberg, S.H., et al., *Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9*. Nature, 2015. **527**(7576): p. 110.
236. *CRISPR Therapeutics: disponible sur : <http://www.crisprtx.com/crispr-platform/crispr-cas9-gene-editing.php?section=therapeutic-approach> Consulté le 30 Octobre 2017.*
237. Singh, K., et al., *Efficient In Vivo Liver-Directed Gene Editing Using CRISPR/Cas9*. Molecular Therapy, 2018. **26**(5): p. 1241-1254.
238. Bachtarzi, H., *Ex vivo and in vivo genome editing: a regulatory scientific framework from early development to clinical implementation*. Regenerative medicine, 2017. **12**(8): p. 1015-1030.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *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 ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



- أن أراقب الله في مهنتي
 - أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
 - أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
 - أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترف.
 - أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
 - لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.
- والله على ما أقول شهيد



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس بالرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط



أطروحة رقم : 08

سنة : 2019

الطب الشخصي

بين العلاج المستهدف والعلاج الجيني أطروحة :

قدمت و نوقشت علانية يوم :
من طرف

السيد : ممين مغيلان

المزاداد في 19 أبريل 1994 بالدار البيضاء

لنيل شهادة

دكتور في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الطب الشخصي، العلاج الموجه، متبثات التيروزين كيناز، العلاج الجيني،

كريسبر - كاس - 9

أعضاء لجنة التحكيم

رئيس

السيد أحمد كوزي

أستاذ في طب الأطفال

مشرف

السيد عز الدين إبراهيمي

أستاذ في البيوتكنولوجيا

السيدة منى الودغيري

أستاذة في البيوتكنولوجيا

أعضاء

السيدة نعيمة الحافظي

أستاذة في طب الأطفال