

III- Immunothérapie

L'immunothérapie désigne l'ensemble des méthodes pour traiter une maladie par l'utilisation de moyens immunitaires, qu'ils soient naturels ou non. La difficulté de l'immunothérapie concernant les ESST est l'absence de réaction immunitaire chez les patients en raison de la tolérance naturelle de l'hôte pour la PrP^c, protéine synthétisée par l'individu lui-même. Cependant, plusieurs essais thérapeutiques avec différentes approches immunitaires ont été testés.

A- Immunisation active avec la PrP ou des peptides de la PrP

L'immunisation active consiste à stimuler le système immunitaire de l'hôte pour que l'organisme lutte contre l'agent pathogène responsable de la maladie.

Les essais thérapeutiques d'immunisation active ont pour principe d'injecter des peptides dérivés de la protéine prion ou la protéine prion elle-même pour que l'organisme de l'hôte lutte contre l'infection par les prions lors de leur inoculation (Tableau 9).

En 2002, les premiers essais ont consisté en l'injection de protéine prion recombinante chez des souris avant de leur inoculer l'agent de la tremblante. Un délai du temps d'incubation de 9% a été obtenu, mais lorsque l'immunisation est faite après l'inoculation du prion aucun délai n'est obtenu (Sigurdsson *et al.*, 2002).

Les délais obtenus par l'équipe de Goñi en 2008 se sont révélés encourageants (100%). Avant l'infection des souris par voie orale, celles-ci ont été vaccinées cinq fois à l'aide de *Salmonella Typhimurium* exprimant la PrP murine. Il est à noter également que l'incidence de la maladie a diminué de 70% chez les souris vaccinées (Goñi *et al.*, 2008).

Tableau 9: Essais d'immunisation active des ESST

Molécule	Modèle animal	Prions	Inoculation prions	Dose par semaine et par animal	Début traitement	Fin traitement	Délai (%)	Référence
PrPrec murine	Souris CD-1	139A	i.p.	2 x 50 µg sur 2 semaines puis 1 fois par mois	14 semaines avant inoculation	Signes cliniques	9	(Sigurdsson <i>et al.</i> , 2002)
				50 µg 1 fois par mois	24 heures p.i.	Signes cliniques	----	
Vaccin Salmonella exprimant la PrP de souris	Souris CD-1	139A	Voie orale	vaccination orale tous les jours	7 semaines avant inoculation	4 semaines p.i.	11	(Goni <i>et al.</i> , 2005)
	Souris CD-1 répondant fortement au vaccin (IgG et IgA élevés)	139A	Voie orale	5 Vaccinations sur 7 semaines	7 semaines avant inoculation	Jour de l'inoculation	100	(Goni <i>et al.</i> , 2008)
HaPrP105-128 HaPrP119-146 HaPrP142-179	Hamster Syrien	263K	i.p.	8 x 10 µg sur 4 mois	20 jours avant inoculation	100 jours p.i.	13 20 19	(Magri <i>et al.</i> , 2005)
PrP25-242 bovine	Souris BALB/c	Fukuoka-1	i.p.	5 x 100 µg sur 2 semaines	4 semaines avant inoculation	1 semaine p.i.	11	(Ishibashi <i>et al.</i> , 2007)
PrP165-178 murine	Souris C57Bl/6	RML	i.p.	2 x 50 µg sur 32 jours	15 jours avant inoculation	17 jours p.i.	9	(Pilon <i>et al.</i> , 2007)
PrPhumaine	Souris C57Bl/6	139A	i.p.	3 Vaccinations sur 8 semaines	5 semaines avant inoculation	3 semaines p.i.	8	(Rosset <i>et al.</i> , 2009)

Légende : Suivant les cas, les souris sont inoculées par les prions par voie intracérébrale (i.c.), par voie intrapéritonéale (i.p.) ou par voie orale. La vaccination peut débuter soit avant l'inoculation par les prions, soit post-inoculation prions (p.i.). Les délais obtenus sont calculés en comparant la durée d'incubation de la maladie des souris traitées par rapport aux souris contrôles n'ayant pas reçu le traitement.

(Source : Toupet, 2009)

B- Immunisation passive

L'immunisation passive consiste à apporter au patient des éléments du système immunitaire spécifiques d'une pathologie. Le plus souvent ces éléments sont des anticorps, ou des fragments d'anticorps.

De nombreux anticorps se sont révélés efficaces *in vitro* avec différents mécanismes d'action :

- Liaison à la PrPc, bloquant sa conversion en PrPres : anticorps 6H4 (Enari *et al.*, 2001), ICSM35 et ICSM18 (White *et al.*, 2003, Beringue *et al.*, 2004).
- Inhibition de l'interaction de la PrPc avec la PrPres : anticorps Fab D13 et D18 (Peretz *et al.*, 2001), scFv-D18 (Wuertzer *et al.*, 2008), SAF34 (Perrier *et al.*, 2004).
- Réduction de la demi-vie métabolique de la PrPc : anticorps SAF61 (Perrier *et al.*, 2004).
- Blocage de la conversion de la PrPc en PrPres par interaction avec l'un des composés intervenant dans le mécanisme de conversion : anticorps 8B4 et 8H4 (Sigurdsson *et al.*, 2003).
- Inhibition de la liaison de la PrP à son récepteur de la membrane cellulaire (anticorps anti-LRP/LR) : anticorps W3 (Leucht *et al.*, 2003), scFv-S18 (Zuber *et al.*, 2008a).
- Mécanisme d'action non défini : anticorps BAR236 (Féraudet *et al.*, 2005, Féraudet-Tarisse *et al.*, 2010).

Les fragments Fab (ab pour *antigen binding*) et Fc (c pour *cristallisable*) utilisés pour les essais d'immunisation passive correspondent à des fragments de la molécule d'immunoglobuline. Les fragments Fab ont la propriété de se lier à l'antigène et le fragment Fc a des fonctions de liaisons à des récepteurs spécifiques et d'activation du complément. Enfin les fragments scFv (*single chain Fragment variable*) sont des structures de petites tailles capables de se lier à un antigène.

Les essais thérapeutiques *in vivo* ont révélé des résultats intéressants (Tableau 10 et 11). Ainsi, des souris infectées par voie périphérique demeurent asymptomatiques jusqu'à 500 jours après l'inoculation du prion suite à l'administration des anticorps anti-PrP ICSM35 et ICSM18 (White *et al.*, 2003). Ces anticorps reconnaissent respectivement les épitopes 94-105 et 144-152 de la protéine prion. Le protocole d'administration est assez lourd : le traitement doit être administré deux fois par semaine dans le mois qui suit l'inoculation. Néanmoins, lorsque le traitement débute au moment de l'apparition des signes cliniques, c'est-à-dire à un stade tardif de la maladie, qui correspond encore aujourd'hui au moment où les ESST sont diagnostiquées chez l'Homme ou chez l'animal dans la majorité des cas, aucune augmentation du temps d'incubation n'est obtenue chez les animaux traités. Enfin, aucune augmentation du temps d'incubation n'est observée lorsque l'inoculation du prion se fait par voie intracérébrale (Tableau 10).

Tableau 10: Essais d'immunisation passive avec les anticorps ICSM35 et ICSM18

Molécule	Modèle animal	Prions	Inoculation prions	Dose par semaine et par animal	Début traitement	Fin traitement	Délai (%)	Référence
ICSM35	Souris FVB/N	RML	i.p.	2 x2 mg	7 j. p.i.	signes cliniques	> 253	(White <i>et al.</i> , 2003)
ICSM35	Souris FVB/N	RML	i.p.	2 x2 mg	30 j. p.i.	signes cliniques	> 253	
ICSM35	Souris FVB/N	RML	i.p.	2 x2 mg	CO	signes cliniques	---	
ICSM35	Souris FVB/N	RML	i.c.	2 x2 mg	7 j. p.i.	signes cliniques	---	
ICSM35	Souris FVB/N	RML	i.c.	2 x2 mg	CO	signes cliniques	---	
ICSM18	Souris FVB/N	RML	i.p.	2 x2 mg	7 j. p.i.	signes cliniques	> 253	
ICSM18	Souris FVB/N	RML	i.p.	2 x2 mg	30 j. p.i.	signes cliniques	> 253	
ICSM18	Souris FVB/N	RML	i.p.	2 x2 mg	CO	signes cliniques	---	
ICSM18	Souris FVB/N	RML	i.c.	2 x2 mg	7 j. p.i.	signes cliniques	---	
ICSM18	Souris FVB/N	RML	i.c.	2 x2 mg	CO	signes cliniques	---	

Légende : Suivant les cas, les souris sont inoculées par les prions par voie intracérébrale (i.c.) ou par voie intrapéritonéale (i.p.). Les anticorps sont administrés après inoculation par les prions (p.i.). Le terme « clinical onset » (CO) désigne le moment où les premiers signes cliniques de la maladie apparaissent. Il se situe aux alentours de 129-136 jours p.i. pour une souris inoculée prions par voie i.c. et aux alentours de 168-177 jours p.i. pour une souris inoculée prions par voie i.p. Les délais obtenus, sont calculés en comparant la durée d'incubation de la maladie des souris traitées par rapport aux souris contrôles n'ayant pas reçu le traitement.

(Source : Toupet, 2009)

Les délais obtenus lors des autres essais d'immunisation passive avec d'autres anticorps se sont révélés moins importants (Tableau 11). Les anticorps 8B4 et 8H4 ne se sont pas révélés efficaces *in vivo*. Cette absence de résultats peut être liée aux concentrations d'anticorps utilisées qui sont cent fois inférieures à celles utilisées avec les anticorps ICSM35 et ICSM18 (Sigurdsson *et al.*, 2003).

Les injections intra-cérébrales de vecteurs AAV (Virus Adéno-Associé) exprimant l'anticorps scFv-D18 trente jours avant l'inoculation du prion permettent d'obtenir un délai intéressant de 26% chez les souris traitées (Wuertzer *et al.*, 2008).

L'anticorps BAR236 permet quant à lui d'obtenir un délai de 45% chez les souris traitées par rapport aux souris non traitées (Féraudet-Tarisse *et al.*, 2010).

Tableau 11: Autres essais d'immunisation passive des ESST

Molécule	Modèle animal	Prions	Inoculation prions	Dose par animal	Début traitement	Fin traitement	Délai (%)	Référence
8B4 et 8H4	Souris CD-1	139A	i.p.	1 x 50 µg par semaine	Inoculation prions	Signes cliniques	-----	(Sigurdsson <i>et al.</i> , 2003)
scFv-D18 via des AAV2	Souris C57Bl/6	RML	i.p.	2 injections simultanées (9 x 10 ⁹ p.p. par injection) par semaine	30 jours avant inoculation	----	26	(Wuertzer <i>et al.</i> , 2008)
scFv-S18	Souris C57BL/6	RML	i.p.	1 x 1 mg par semaine	1 jour avant inoculation	8 semaines	4 ?	(Zuber <i>et al.</i> , 2008a)
scFv-S18 via des AAV2	Souris C57Bl/6	RML	i.c.	1 injection (5 x 10 ⁹ p.p.) par semaine	2 semaines avant inoculation	1 seule injection	----	(Zuber <i>et al.</i> , 2008b)
BAR236	Souris C57Bl/6	Me7	i.p.	1 mg tous les 10 jours	10 jours p.i.	60 jours p.i.	45	(Féraudet-Tarisse <i>et al.</i> , 2010)

Légende : Suivant les cas, les souris sont inoculées par les prions par voie intracérébrale (i.c.) ou par voie intrapéritonéale (i.p.). L'immunisation passive débute avant l'inoculation par les prions ou le jour même de l'inoculation. Les délais obtenus, sont calculés en comparant la durée d'incubation de la maladie des souris traitées par rapport aux souris contrôles n'ayant pas reçu le traitement. p.p. : particules physiques.

(Source : d'après Toupet, 2009)

IV- Stratégie de thérapie génique

A- Généralités

Les résultats des nombreux essais en chimiothérapie ou en immunothérapie, bien qu'encourageants parfois, ne se sont pas encore révélés suffisamment efficaces pour le traitement des ESST, en particulier lors des essais *in vivo* au stade tardif du développement de la maladie. Avec l'avancée des technologies de thérapie génique, certaines équipes de recherche sur le traitement des ESST se sont tournées vers la thérapie génique à la recherche de nouvelles stratégies potentiellement plus efficaces dans la lutte contre les maladies à prion.

La base de la thérapie génique est l'utilisation de vecteurs de transfert de gènes. Il en existe deux types : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Les virus sont aujourd'hui les vecteurs naturels les plus évolués et les plus efficaces dans le transfert de l'information génétique étrangère dans une cellule. À la suite de cette observation, de nombreux virus ont été adaptés pour être les vecteurs d'un gène d'intérêt vers une cellule cible. Ainsi les virus les plus utilisés pour la thérapie génique sont les lentivirus, les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV) et le virus *Herpès Simplex* (Tableau 12).

Les vecteurs non viraux correspondent à une molécule d'ADN nu, associée à des complexes lipidiques ou des polymères pour faciliter la traversée de la membrane des cellules et la rentrée des molécules d'ADN. A l'inverse des vecteurs viraux, ils sont plus faciles à produire, à manipuler et à stocker. Cependant, leur efficacité est bien moindre que celle des virus pour transférer une information génétique dans une grande population de cellules. De plus, leur utilisation s'accompagne souvent d'une toxicité importante.

Actuellement, la très grande majorité des essais de thérapie génique utilisent les virus pour assurer le transfert et l'expression du gène d'intérêt de manière stable et efficace. Les modifications préalables avant leur utilisation ont pour but de supprimer les séquences responsables de la réplication et de la virulence, tout en conservant les propriétés de pénétration des cellules cibles et l'expression du gène d'intérêt.

Tableau 12: Principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

Vecteur	Description	Taille de l'insert	Tropisme cellulaire	Potentiel inflammatoire	Intégration dans le génome	Avantages	Inconvénients
Rétrovirus	ARN simple brin	8 kb	Cellules en division seulement	Faible	Oui	- Durée d'expression du transgène assez longue	- Transduction des cellules en division uniquement - Risque de mutation insertionnelle
Lentivirus	ARN simple brin Rétrovirus dérivés du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), du Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS) ou bien encore du Virus de l'Immunodéficience Féline (VIF)	8 kb	Cellules quiescentes et en division	Faible	Oui	- Tropisme pour les cellules quiescentes et en division - Expression à long terme	- Taille limitée du gène - Risque de mutation insertionnelle
Adénovirus	ADN double brin	8 kb à 30 kb	Cellules quiescentes et en division	Elevé	Non	- Très forte efficacité de transfection	- Forte immunogénicité liée à la capside
Virus associés aux adénovirus (AAV)	ADN simple brin Nécessité de les associer aux adénovirus pour les propriétés d'encapsidation	<5 kb	Cellules quiescentes et en division	Faible	<10%	- Peu immunogène - Durée d'expression longue	- Taille limitée du gène
Herpès Simplex HSV-1	ADN double brin	40 kb à 150 kb	Tropisme naturel pour les neurones	Elevé	Non	- Large capacité pour la taille du gène	- Tropisme pour les neurones donc transduction moins efficace pour les autres cellules - Induit une toxicité cellulaire

(Source : d'après Thomas *et al.*, 2003)

B- Essais de thérapie génique, *in vivo*, pour le traitement des ESST

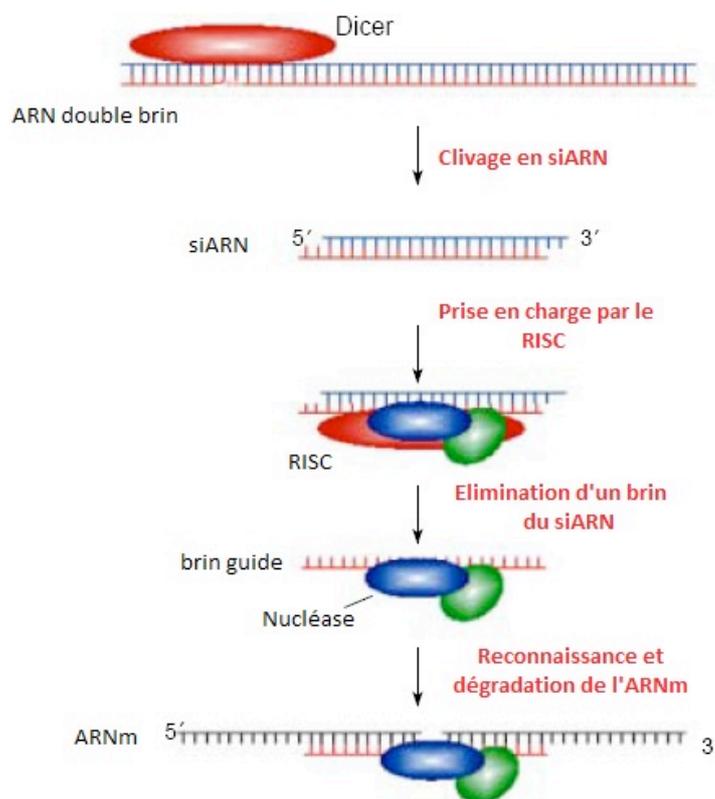
Les premiers essais thérapeutiques *in vivo* ont été réalisés en utilisant des vecteurs de transfert de gènes ciblant soit le gène codant pour la protéine prion, soit le gène codant pour le récepteur de la laminine LRP/LR, qui permet l'internalisation des protéines prion, ou enfin en utilisant les propriétés dominantes négatives de la protéine prion.

Pour interférer avec le gène de la protéine prion ou le gène du récepteur à la laminine, les chercheurs utilisent des petits ARN interférents ou siARN (*Short Interfering RNA*), ou des shARN (*Short Hairpin RNA*). Ces deux acides nucléiques sont des ARN simples ou doubles brins qui vont interférer avec un ARN messager (ARNm) spécifique. Cette interaction permet la dégradation de cet ARN cible, et par conséquent diminue la traduction de l'ARN messager en la protéine qu'il code.

Le mode d'action des siARN est représenté dans la figure 34. L'ARN double brin présent dans la cellule est pris en charge par une ribonucléase nommée Dicer. Cette ribonucléase clive l'ARN double brin toutes les 19 à 22 paires de bases (pb), formant ainsi des siARN. Les siARN sont ensuite pris en charge par un complexe protéique cellulaire nommé RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Un des brins du siARN est alors éliminé, et l'autre brin appelé brin guide conduit le complexe RISC vers les ARN messagers possédant une séquence complémentaire au brin guide. Enfin, le complexe RISC va couper l'ARN messager grâce à la nucléase qui le compose (Narry Kim, 2003).

Les shARN quant à eux sont de petits ARN possédant une boucle en forme d'épingle à cheveux. L'utilisation de vecteurs lentiviraux est nécessaire pour introduire les shARN dans les cellules. Ils sont pris en charge dans la cellule par la ribonucléase Dicer, conduisant à la formation de siARN (Narry Kim, 2003).

Figure 34: Mode d'action des ARN interférents



(Source : d'après Narry Kim, 2003)

1- Essais de thérapie génique ciblant le gène codant pour la protéine prion

Les premiers essais *in vitro* sur des cultures cellulaires infectées par les prions ont concerné des siARN nus (absence de vecteur de transfert de gènes) ciblant les codons 392-410 du gène de la protéine prion. Une fois à l'intérieur des cellules, ces siARN permettent la diminution des taux de PrP^c et de PrP^{Sc} (Daude *et al.*, 2003).

Par la suite, des essais *in vivo* ont été réalisés en utilisant des shARN ciblant les codons 512-532 du gène codant pour la protéine prion. L'utilisation de vecteurs lentiviraux est nécessaire pour la transduction des shARN à l'intérieur de cellules souches embryonnaires de souris. Ainsi des souris chimères sont créées, puis la protéine prion est inoculée par voie intracérébrale. La durée de vie de ces souris est augmentée de 7 à 30% en fonction de leur taux de chimérisme. Cette observation s'accompagne d'une diminution des taux de PrP^c et de PrP^{Sc} dans le cerveau (Pfeifer *et al.*, 2006). Bien que les résultats soient encourageants, cette stratégie thérapeutique basée sur la création de chimères est peu envisageable chez l'Homme. En revanche, elle peut être intéressante dans le domaine de l'élevage pour la création d'animaux transgéniques résistants aux ESST.

C'est en suivant cette stratégie qu'une équipe est parvenue à créer un fœtus de chèvre transgénique à partir de vecteurs lentiviraux portant un shARN ciblant le gène de la protéine prion. Le taux de PrP est diminué de 90% dans ce fœtus par rapport au fœtus sauvage (Golding *et al.*, 2006).

2- Essais de thérapie génique ciblant le gène codant pour le récepteur de la protéine prion

Une autre stratégie de thérapie génique consiste à cibler le gène du récepteur à la laminine LRP/LR responsable de l'internalisation de la PrP.

En 2003, l'utilisation de siARN nus *in vitro* sur des cultures cellulaires ciblant le gène codant pour le récepteur à la laminine a permis d'obtenir une réduction importante du taux de PrP^{Sc} dans les cellules infectées. Cette observation a également permis de confirmer l'intérêt de cibler le récepteur à la laminine pour le traitement des ESST.

Par la suite, des essais *in vivo* ont été réalisés en utilisant des vecteurs lentiviraux contenant des shARN dirigés contre le gène codant pour le récepteur LRP/LR. L'inoculation intracérébrale de la protéine prion a eu lieu deux semaines après le début du traitement. Une faible augmentation du temps de survie de 4% chez les souris traitées a été observée (Pflanz *et al.*, 2009a).

3- Essais de thérapie génique utilisant les propriétés dominantes négatives de la protéine prion

Cette stratégie thérapeutique repose sur l'observation de polymorphismes du gène codant pour la PrP protecteurs vis-à-vis des ESST. Ces polymorphismes existent naturellement, notamment chez l'Homme ou chez le mouton (voir II- C- 1- La tremblante des petits ruminants). Ainsi chez les ovins, le polymorphisme sur les codons 136 (A-alanine ou V-valine), 154 (R-arginine ou H-histidine) et 171 (R-arginine ou Q-glutamine) est associé à une modification de susceptibilité des moutons vis-à-vis de la tremblante (Andreoletti *et al.*, 2002). Chez la souris, des polymorphismes du gène de la PrP

protecteurs de la protéine prion ont été rapportés (Kaneko *et al.*, 1997b). Ce sont les mutations Q167R et Q218K chez la souris. Ces travaux sur la souris ont abouti aux conclusions suivantes :

- Les protéines prions mutées PrPQ167R et PrPQ218K ne peuvent pas être converties en leurs formes infectieuses PrPres.
- Lors d'expériences de co-transfection, les protéines prions mutées inhibent la formation de la PrPres à partir de la PrPc sauvage.

Les mutations Q167R et Q218K ont alors été qualifiées de mutations « dominantes négatives ».

Ainsi, des essais thérapeutiques *in vivo* ont été entrepris chez la souris en se basant sur les propriétés dominantes négatives de certaines mutations (Toupet *et al.*, 2008). Les vecteurs viraux utilisés sont des lentivirus portant le gène codant pour les protéines PrPQ167R et PrPQ218K. Le traitement est administré au stade tardif de la maladie, c'est-à-dire après la neuroinvasion de la PrPres, entre 30 et 160 jours post-inoculation.

Les délais obtenus en utilisant le dominant négatif PrPQ218K en une injection intracérébrale unique sont de 12% après injection du traitement 35 jours p.i. et de 11% 105 jours p.i. . La stratégie de multiples injections simultanées intracérébrales n'a en revanche pas permis d'augmenter la durée de vie des animaux traités.

Le potentiel thérapeutique du dominant négatif PrPQ167R a également été évalué. Un délai de 12% a été obtenu pour le traitement effectué 35 jours p.i. consistant en une injection intracérébrale unique. Enfin, l'implantation d'une canule intracérébrale a permis d'administrer le traitement à 80 jours puis 95 jours p.i. et un délai intéressant de 20% par rapport aux souris témoins a été obtenu.

4- Essais de thérapie génique utilisant les dimères solubles de PrP

Une étude de 2008 suggère que des dimères solubles de PrP, appelés PrP-Fc2, présentent une activité anti-prion (Genoud *et al.*, 2008). Le gène codant pour ces dimères est intégré à un vecteur lentiviral puis injecté par voie intracérébrale à des souris infectées par le prion. Les auteurs observent une diminution de l'accumulation de la PrPres dans la plupart des parties du cerveau. Les souris ayant reçu le traitement avant l'inoculation de la protéine prion ont un délai de survie supérieur de 72 jours par rapport aux témoins, et de 25 jours lorsque le traitement est administré trente jours après l'inoculation.

V- Stratégie de thérapie cellulaire

A- Généralités

Les cellules souches sont définies par leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en différentes lignées cellulaires *in vitro* ou *in vivo*. Elles sont classées selon leur potentiel de différenciation :

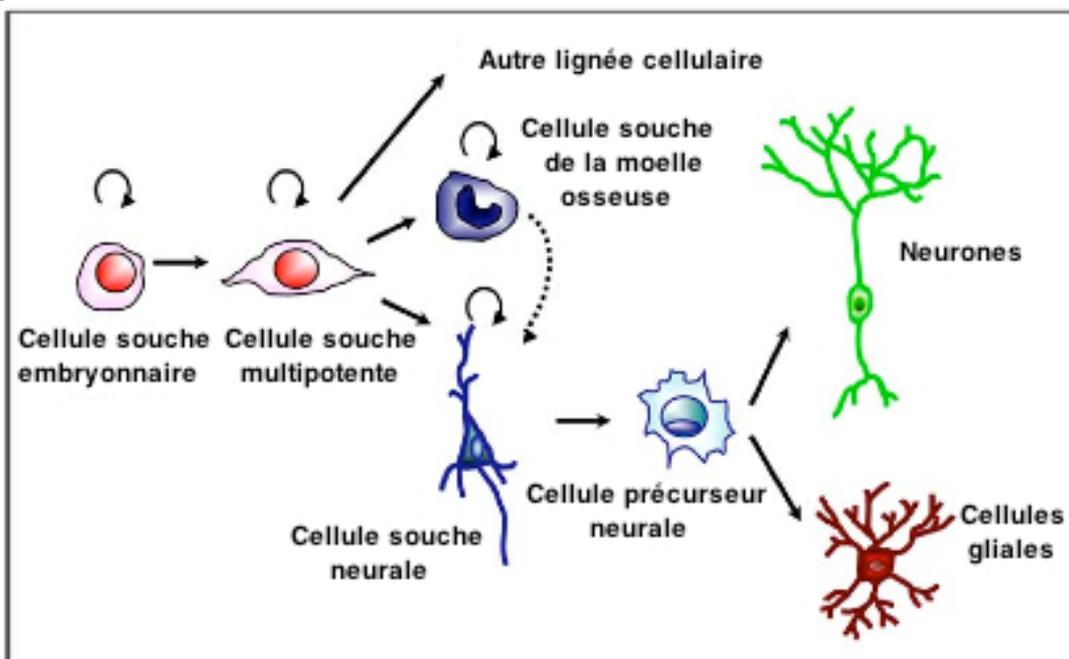
- Les cellules souches unipotentes, qui ne peuvent donner qu'une seule sorte de cellule (elles peuvent cependant, comme toute cellule souche, s'auto-renouveler)
- Les cellules souches multipotentes, susceptibles de donner différents types de cellules, mais spécifiques d'un lignage cellulaire donné
- Les cellules souches pluripotentes, capables de donner tous les types cellulaires sauf les annexes embryonnaires
- Les cellules souches totipotentes, pouvant donner tous types cellulaires, et donc un organisme entier

Les stratégies thérapeutiques utilisant les cellules souches sont récentes. Elles sont notamment utilisées dans le traitement des maladies neurodégénératives pour leur capacité à suppléer les cellules neuronales détruites, et c'est donc tout naturellement que les équipes de recherche s'orientent vers la mise au point de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de cellules souches pour les ESST (Figure 35).

Les cellules souches utilisées peuvent dériver de différentes sources :

- Les cellules souches embryonnaires : cellules souches pluripotentes issues d'un embryon au stade de blastocyste
- Les cellules souches neurales fœtales : cellules souches multipotentes d'origine fœtale
- Les cellules souches dérivées de la moelle osseuse : cellules souches multipotentes, notamment capables de se différencier en cellules neurales

Figure 35: Différentes cellules souches utilisées pour le traitement des maladies neurodégénératives



(Source : d'après Relaño-Ginés *et al.*, 2009)

B- Essais de thérapie cellulaire, in vivo, pour le traitement des ESST

Les essais de thérapie cellulaire pour le traitement des ESST sont les plus récents. L'utilisation de cellules souches a été motivée par les résultats encourageants obtenus lors d'essais thérapeutiques pour d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Huntington.

La première étude *in vivo* publiée concerne l'utilisation de cellules souches neurales fœtales (Brown *et al.*, 2001). Des cellules souches provenant d'embryons de souris mutées ne possédant pas le gène codant pour la PrP ont été injectées à des souris atteintes par l'agent de la tremblante. Les cellules sont injectées dans l'hippocampe 150 jours après l'inoculation du prion, c'est-à-dire au début de la destruction des neurones. Malgré l'absence de délais de survie supplémentaires chez les souris traitées par rapport aux souris témoins, le nombre de neurones fonctionnels dans l'hippocampe est supérieur de 49% 21 jours après l'injection des cellules souches et 53% avant la mort des souris traitées par rapport aux témoins.

Une seule autre étude de 2011 rapporte un essai de thérapie cellulaire *in vivo* (Relaño-Ginés *et al.*, 2011). Les cellules souches utilisées sont des cellules souches fœtales neurales provenant soit de souris sauvages, soit de souris mutées n'exprimant pas la protéine prion, soit de souris mutées exprimant la protéine prion porcine. Les différentes cellules souches sont injectées par voie intracérébrale au niveau de l'hippocampe ou du ventricule latéral, 20 jours avant l'apparition des signes cliniques (100 jours post-inoculation) ou au moment de l'apparition des signes cliniques (120 jours post-inoculation).

Une augmentation significative des délais d'incubation (11,3% à 21,9%) et de survie (13,3% à 16,6%) est observée chez les souris traitées 100 jours p.i. par rapport aux animaux témoins. Il est important de remarquer qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes cellules souches utilisées, en particulier pour les cellules provenant de souris non mutées, relançant l'intérêt pour l'utilisation de ces cellules souches qui sont pourtant *a priori* plus sensibles à l'infection par le prion. Enfin, une diminution de l'astrocytose est observée aux lieux d'injection des cellules souches.

Une légère augmentation des temps d'incubation et de survie, mais non significative, est observée chez les souris traitées 120 jours post-inoculation.

La stratégie de thérapie cellulaire est l'approche la plus récente des équipes de recherche, et les études sont peu nombreuses pour le moment. Les résultats sont cependant encourageants, en particulier pour substituer la perte neuronale au stade tardif de la maladie.

VI- Limites des stratégies thérapeutiques actuelles

Aussi bien en chimiothérapie qu'en immunothérapie, de nombreuses molécules se sont révélées efficaces *in vitro* pour empêcher la formation de PrPres dans des cultures cellulaires infectées par le prion. Cependant les résultats des essais *in vivo* ont révélé leur relativement faible impact sur le développement de la maladie. D'une manière générale, les essais *in vivo* ont donné les meilleurs résultats lorsqu'une ou plusieurs des conditions suivantes sont remplies :

- Le traitement doit cibler la phase asymptomatique de la maladie.
- Le traitement doit débuter avant ou le jour même de l'inoculation du prion.
- Le prion ne doit pas être inoculé par voie intracérébrale.
- Le traitement doit être administré à de fortes doses, plusieurs fois par semaine et jusqu'à l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie.

Ces conditions expliquent bien toute la difficulté des équipes de recherche dans la mise au point d'un traitement efficace contre les ESST. Il faut en plus ajouter d'autres problèmes : les molécules de traitement se dégradent d'une manière générale rapidement dans l'organisme, nécessitant une administration répétée. L'autre problème concerne le franchissement de la barrière hémato-méningée par les molécules à visée thérapeutique, en particulier au stade tardif de la maladie où le système nerveux central est envahi par la PrPres. Une alternative expérimentée sur les souris est l'administration intracérébrale du traitement, avec tous les risques de complication liés à la technique que cela comporte.

Devant toutes ces difficultés, les équipes de recherche se sont également tournées vers le récent domaine de la thérapie génique. L'utilisation d'ARN interférents afin de bloquer l'expression du gène codant pour la PrP ou son récepteur LRP/LR ont donné de faibles résultats *in vivo* pour le moment, même si la création d'animaux transgéniques résistants aux ESST est un espoir. Ces pratiques visant à inhiber la production de protéine prion cellulaire restent peu extrapolables à l'Homme, la PrPc ayant plusieurs fonctions dans l'organisme, sa non production pourrait entraîner de fortes perturbations pour la santé.

Ainsi, dans le but final de mettre au point un traitement efficace pour l'Homme, il est nécessaire de mettre au point des stratégies thérapeutiques contournant les problèmes rencontrés dans les essais d'autres molécules tout en évitant les effets secondaires engendrés par les nouveaux traitements. La difficulté essentielle réside dans le fait que le traitement ne peut être débuté qu'au moment du diagnostic de l'ESST, et donc à un stade tardif de la maladie. C'est ainsi qu'en parallèle des recherches sur le traitement des ESST, il est indispensable de parvenir à des méthodes de diagnostic précoce des maladies à prion. Dans cette attente, la thérapie génique utilisant les propriétés dominantes négatives de la protéine prion a donné des résultats encourageants même lorsque le traitement commence au stade tardif de la maladie. Un traitement idéal serait un traitement efficace au stade tardif de la maladie et ne nécessitant pas d'administrations répétées afin de limiter au maximum les effets secondaires potentiels.

VII- Essais thérapeutiques chez l'homme

Plusieurs molécules, dont les essais *in vitro* et *in vivo* se sont révélés intéressants, ont été testés chez l'Homme. La plupart de ces molécules, comme la doxycycline ou la quinacrine par exemple, ont fait l'objet d'une autorisation d'essai chez l'Homme car elles étaient déjà utilisées pour le traitement d'autres pathologies.

La flupirtine a également fait l'objet d'un essai clinique sur 26 patients atteints de la forme sporadique de la MCJ et 2 patients atteints de la forme iatrogène. 100 mg de flupirtine ont été administrés par jour par voie orale. Aucune augmentation de la durée de vie des patients n'a été constatée, mais la démence des malades traités s'est révélée moins importante (Otto *et al.*, 2004).

Les essais *in vitro* très encourageants de la quinacrine ont conduit à la mise en place rapide d'essais sur des patients humains. Les premiers essais sur des malades atteints de la forme sporadique ou du nouveau variant de la MCJ, traités avec 100 mg de quinacrine trois fois par jour par voie orale, n'ont pas permis d'obtenir une augmentation du temps de survie (Haik *et al.*, 2004). Ce résultat décevant a par la suite été confirmé par une étude menée en Grande Bretagne sur 107 patients atteints de différentes formes de MCJ. La même posologie que dans l'étude précédente a été utilisée, et aucun effet sur le développement de la maladie ou sur le taux de mortalité n'a été observé chez les patients traités à la quinacrine. De plus, de nombreux effets secondaires ont été rapportés, tels des vomissements, des troubles digestifs, des infections urinaires ou dans de plus rares cas des arrêts cardiaques (Collinge *et al.*, 2009).

Le pentosan polysulfate (PPS) a aussi fait l'objet d'essais cliniques chez l'homme. Son administration se révèle délicate car le PPS ne passe pas la barrière hémato-méningée. Il est donc nécessaire de l'administrer directement par voie intracérébrale. Ainsi plusieurs patients atteints de la forme sporadique ou du nouveau variant de la MCJ ont été traités pour des délais supplémentaires du temps d'incubation de la maladie variant de 3 à 17 mois. Cependant, les résultats des essais cliniques sont controversés et des effets secondaires ont été observés, tels des infections urinaires ou dans de plus graves cas des hémorragies ou des arrêts cardiaques (Todd *et al.*, 2005, Whittle *et al.*, 2006, Parry *et al.*, 2007).

Enfin, entre juin 2006 et mai 2008, cinquante et un patients atteints de la forme sporadique de la MCJ ou de la forme familiale ont été traités par la doxycycline en Allemagne (Zerr, 2009). La dose de 100 mg par jour de doxycycline a été administrée par voie orale. Même si ce traitement n'a pas permis de guérir les patients, il a permis un allongement de leur durée de vie variable en fonction des patients, avec une moyenne de 4 mois environ. Par ailleurs, aucun effet secondaire important n'a été rapporté.

Malheureusement encore aujourd'hui, aucun traitement ne s'est révélé efficace pour le traitement des maladies à prions. À ce constat vient s'ajouter celui de l'absence de tests fiables pour le diagnostic des individus en phase précoce de la maladie. Les recherches se poursuivent donc pour la mise au point d'une stratégie thérapeutique efficace pour le traitement des ESST, et les avancées notamment en thérapie génique et cellulaire sont porteuses d'espoir pour parvenir à ce but.

[MCours.com](https://www.MCours.com)