



CHAPITRE V.2

LE GENIE GENETIQUE EN MEDECINE



GG → progresser la médecine  physiologie
pathologie

I DIAGNOSTIC

I- 1 Identification d'ADN normaux: empreintes génétiques

I-2 Identification de l'ADN pathologique

- Recherche d'un ADN étranger
- Recherche d'un ADN anormal
 - ✓ Maladies acquises
 - ✓ Maladies héréditaires

II THERAPIE GENIQUE

I DIAGNOSTIC

généralement par hybridations moléculaires

I- 1 Identification d'ADN normaux: empreintes génétiques = identification d'un individu par son ADN ds des cas aussi divers que crime, viol, recherche de paternité, ou l'identification d'un cadavre en comparant ces empreintes génétiques avec un ascendant ou descendant présumé

Le prélèvement contenant l'ADN peut être une gtte de sang, de sperme, cheveux avec racine (cad toute ϕ nucléée)



Parmi les méthodes utilisées (PCR /RFLP)

RFLP: Restriction fragment length polymorphism
= polymorphisme de la taille des fragments de restriction

- Sur l'ADN génomique, il y a des sites de restriction qui sont quasiment constant
- À l'inverse, certains sites sont facultatifs → **polymorphisme moléculaire** soit inter-individuel ou intra-individuel.
- Contrairement au **polymorphisme allélique** (que ds la partie exprimée), le **polymorphisme moléculaire** est sur la totalité du génome

Méthode d'analyse d'un site RFLP

→ La présence / absence de site de restriction:

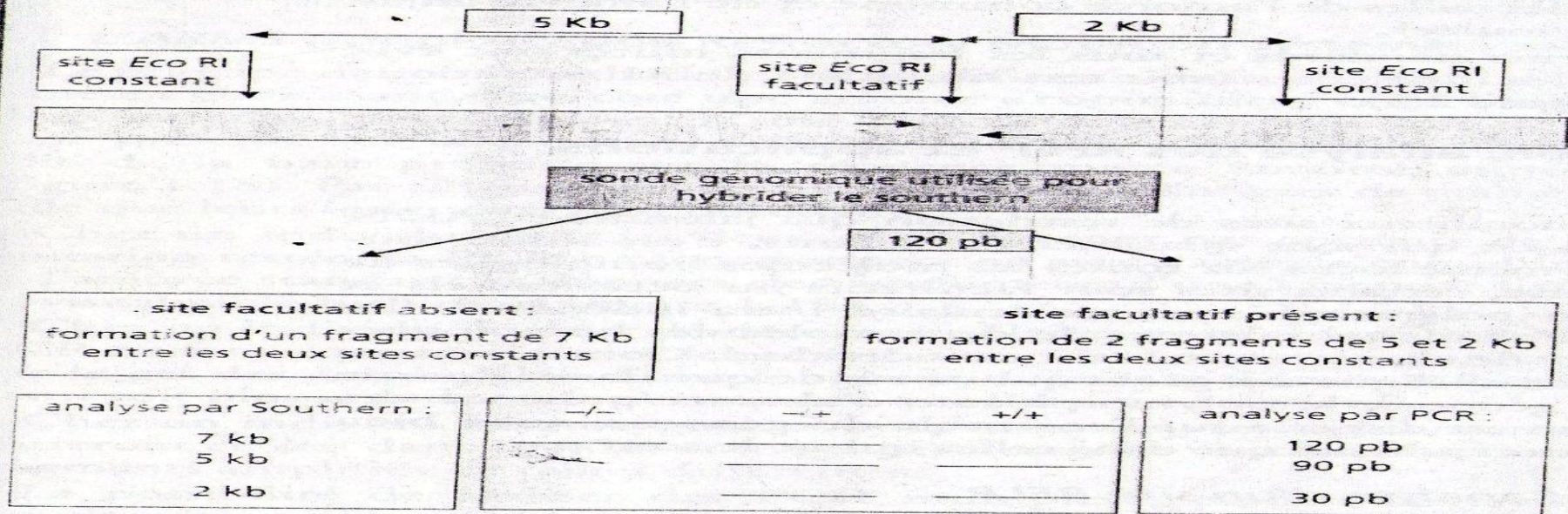
Par digestion totale par l'enz concernée

Visualisable sur

- Southern blot (si on dispose d'une sonde)
- Gel de contrôle de PCR (si on est en mesure d'amplifier le fragment contenant le site de restriction facultatif)
- ➔ Permet de « génotyper » un individu
 - ✓ homozygote -/-
 - ✓ Homozygote +/+
 - ✓ Hétérozygote +/-

Figure 1.20

Définition, conséquences et visualisation d'un RFLP



- Un site facultatif *Eco* RI est situé entre deux sites constants à des distances respectives de 5 et 2 Kb. Son absence ou sa présence conduit à un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction à ce niveau du génome, après digestion totale de l'ADN.
- La taille de ces fragments est visualisable sur un Southern blot : après digestion totale de l'ADN génomique, électrophorèse en agarose, transfert sur membrane et hybridation avec une sonde marquée ayant une homologie partielle avec les trois types de fragments (voir les pointillés sur le schéma en haut).
L'analyse du nombre et de la taille des fragments permet de genotyper les individus étudiés, ici de gauche à droite, -/-, +/- et +/+.
- Si le segment génomique contenant le RFLP étudié a été séquencé, au moins dans ses extrémités, il est possible de l'amplifier par PCR (flèches correspondant aux amorces dans le schéma sous le site facultatif).
La PCR dispense de la digestion totale de l'ADN génomique, de l'électrophorèse et du Southern. Après PCR, on réalise la digestion (polyacrylamide ou agarose).
Dans l'exemple présent on a amplifié un fragment de 120 pb avec des amorces situées à 90 et 30 pb du site facultatif, ce qui aboutit en cas d'absence et/ou de présence à la visualisation de fragments de 120 pb et/ou de 90 et 30 pb.

I-2 Identification de l'ADN pathologique

De + en + les biologistes sont amenés à effectuer des diagnostics et pronostics non plus avec les protéines mais avec l'ADN

➤ Recherche de d'ADN étranger:

Ex: recherche du virus de l'hépatite B: détection de l'ADN directement par hybridation moléculaire

➤ Recherche de l'ADN anormal

✓ Maladies acquises: Ex cancer

Une mutation ponctuelle peut être recherchée ds certains type de cancers (laboratoires très spécialisé)

Synthèse d 'une sonde complémentaire de la région mutée == > hybride stable ==> PCR

✓ **Maladies héréditaires** Ex diagnostic prénatal de la drépanocytose

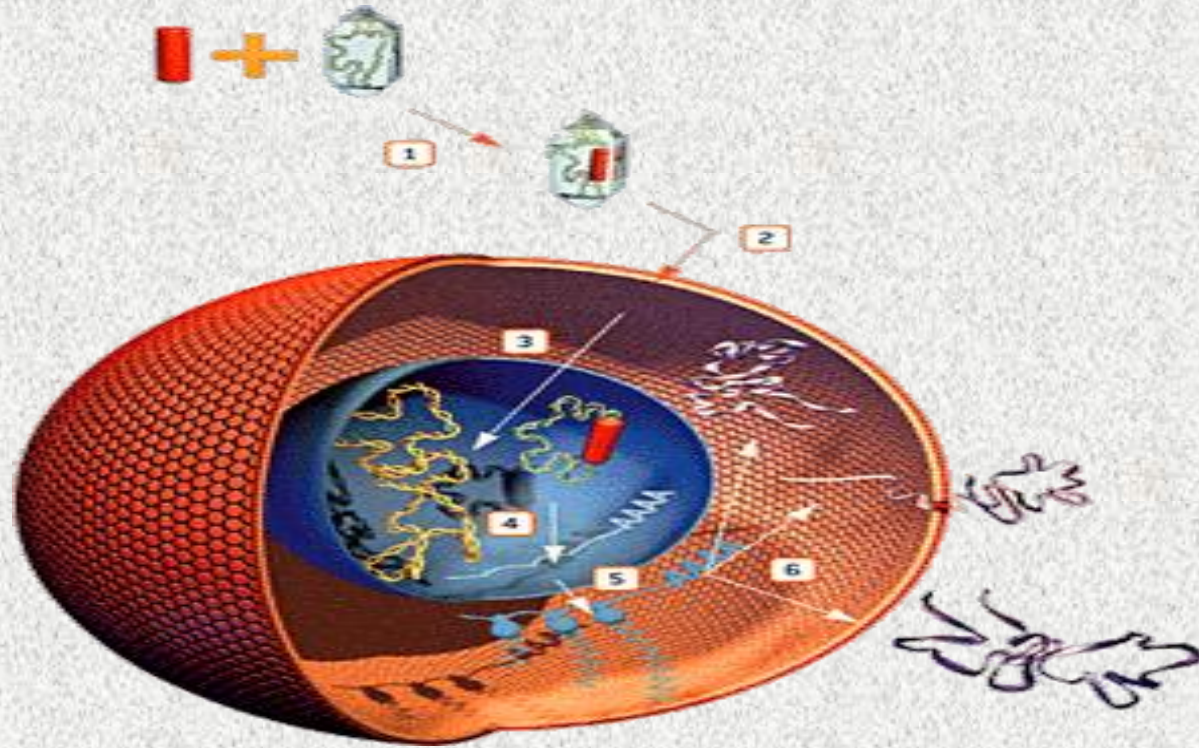
- Une maladie due à une simple mutation au niveau de le β -globine (T remplace A) → protéine anormale (Val remplace Glu) = hémoglobine S
- Pas de moyen pr traiter cette maladie
- Seule possibilité offerte aux famille à risque → diagnostic prénatal
- Si le résultat est + est suffisamment précoce → avortement thérapeutique
- Qlq années → recherche de HbS (4eme mois)
- Actuellement → prélever les c du liquide amniotique (8eme semaine) = **diagnostic prénatal moléculaire (?)**

II- THERAPIE GENIQUE

II- 1 définition (Technique porteuse d'espoir)

- Introduire des gènes sains ds des ç malades
- Le gène n'est pas introduit juste a la place du gène déficient, mais ajouté en plus aux ç
- Gène → transcrit → traduit libérant in situ la protéine manquante ou une autre protéine thérapeutique
- Introduire un gène n'est pas suffisant →
 - ✓ vérifier la toxicité,
 - ✓ ne perturbe pas l'expression d'autres gènes,
 - ✓ quantité de protéine produite n'est ni trop faible ni excessive
 - ✓ Réflexion éthique est nécessaire

MECANISME SIMPLIFIE LA THERAPIE GENIQUE



1. Insertion d'un gène dans un vecteur
2. Contact vecteur / cellule
3. Entrée et transport du gène dans le noyau cellulaire
4. Transcription de l'ARNm à partir du gène
5. Traduction de l'ARNm en protéine
6. Sécrétion, fixation membranaire ou expression cytoplasmique de la protéine

II- 2 différentes autorisations

Avant d'entreprendre une T G chez L'homme
→ nombreuses étapes → franchises → ++ autorisations
du comité d'éthique → obtenues :

- le protocole doit être, au préalable, réussi chez l'A*
- Protocole ne peut être autorisé chez l'homme, que sur les ç somatiques, à l'exclusion des ç germinales → pas de transmission à la descendance.

Interdiction de manipuler des embryons humains

Les qlqs protocoles accordés

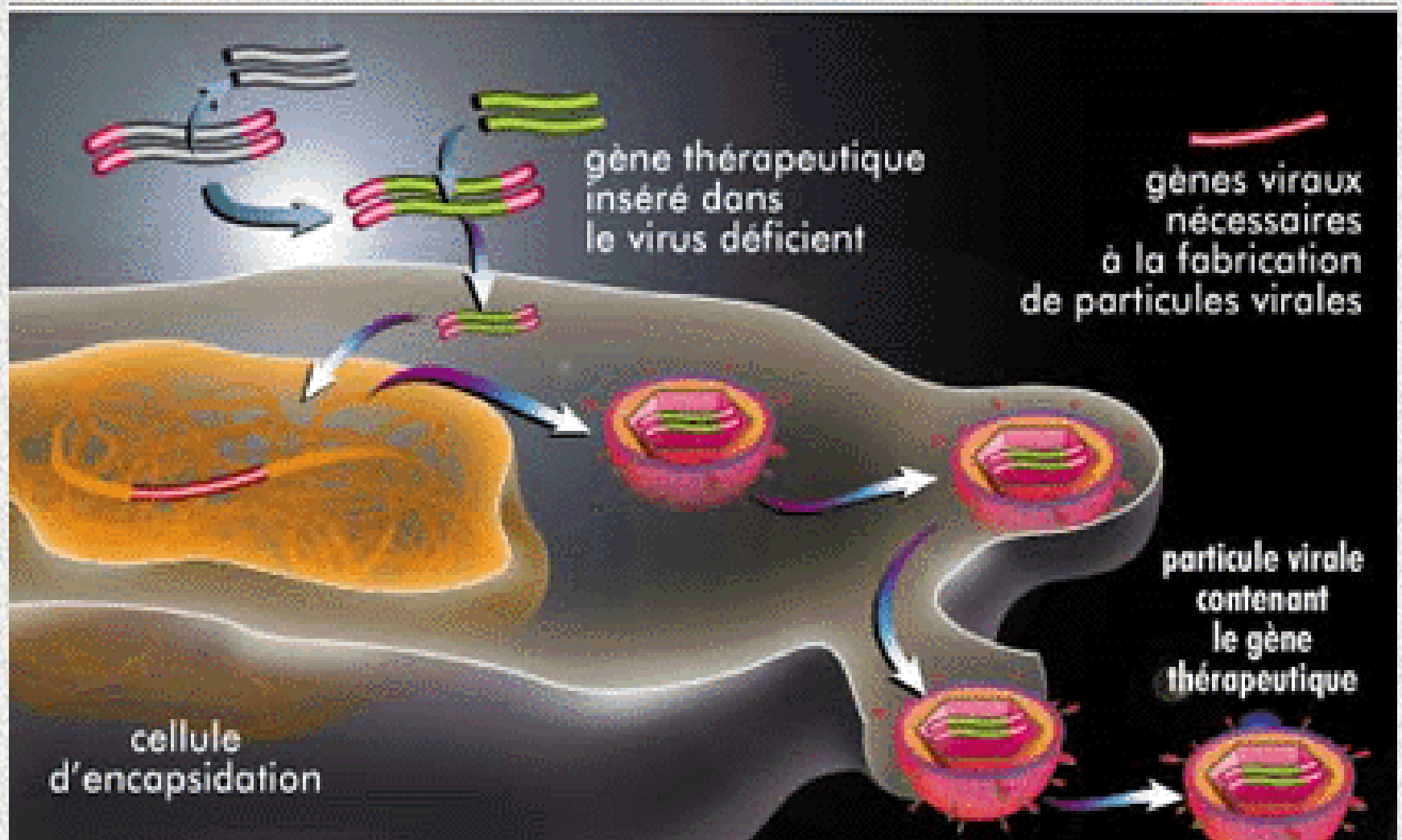
Maladies incurables

- 1ere autorisation, en 1989, aux USA, par ROSEMBERG

II- 3 les vecteurs

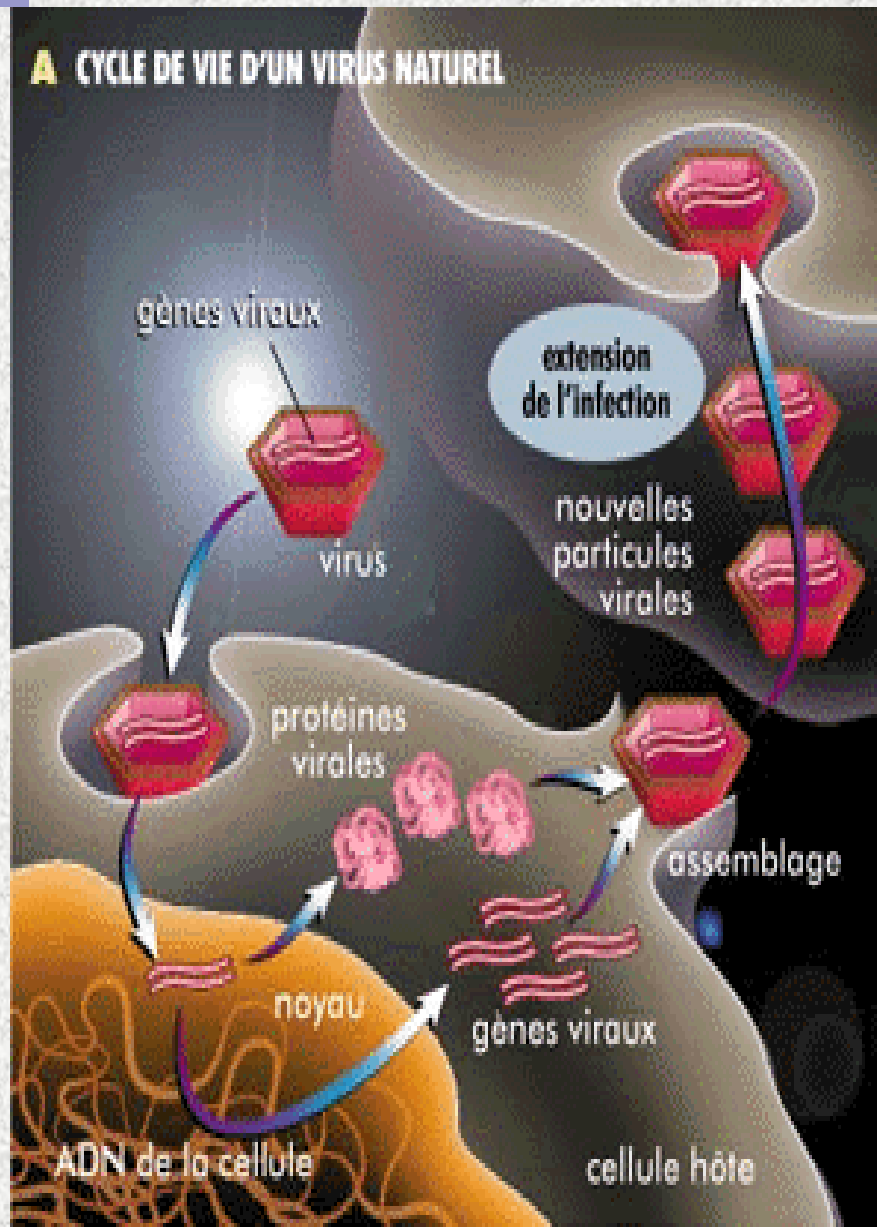
A- vecteurs viraux

- Les virus ont la capacité de franchir, dans certaines conditions, les barrières de protections que dresse le corps humain en cas d'introduction d'ADN étranger dans son génome.
- ils sont capable d'introduire leur matériel génétique dans les cellules qu'ils infectent
- C'est pourquoi les chercheurs ont eu l'idée de les utiliser pour transférer les gènes thérapeutiques dans les $\&$ des patients.
- moyens de transport du gène sain vers les $\&$ malades

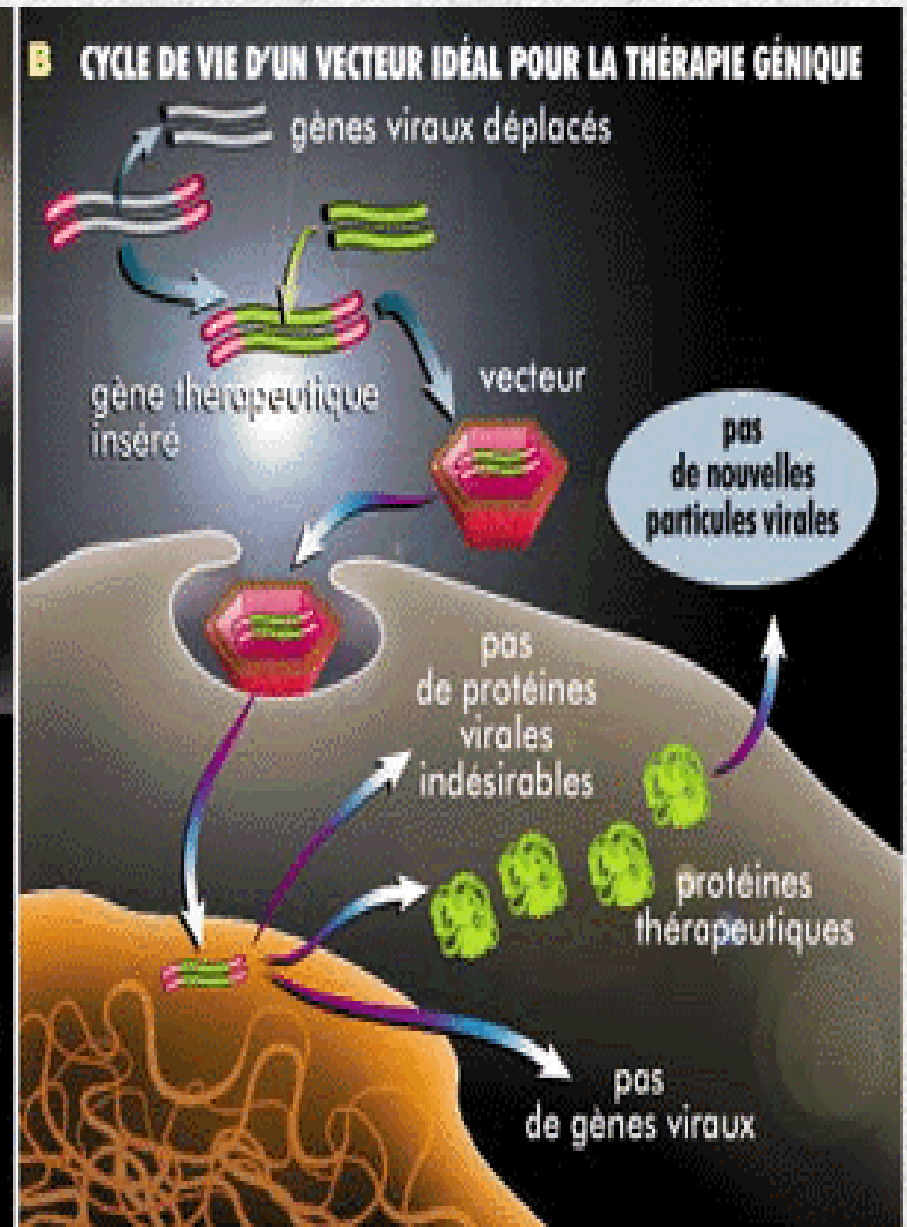


Pour produire des **vecteurs viraux**, on utilise des **cellules** modifiées dites **d'encapsulation**..

A CYCLE DE VIE D'UN VIRUS NATUREL



B CYCLE DE VIE D'UN VECTEUR IDÉAL POUR LA THÉRAPIE GÉNÉIQUE



Vecteurs viraux les plus utilisés

- Rétrovirus
- Adénovirus
- AAV
- virus de l'Herpes

Après modifications (rendus défectifs = gènes essentiels à la réplication sont supprimés)

NB/Chaque virus a ces avantages comme il a ces limites



B- Les vecteurs non viraux

➤ **Liposome**

particule sphérique artificielle formée d'une membrane lipidique et contient à l'intérieur le gène thérapeutique

➤ **Micro-injection**

Injection directe de l'ADN dans le noyau observé sous microscope

II- 4 TECHNIQUES DE LA THERAPIE GENIQUE:

A/Thérapie génique ex vivo « in vitro »

prélever des C $\rightarrow$ les traiter (introduire un gène qui corrige la déficience responsable de la maladie $\rightarrow$ Ces C au génome modifié $\rightarrow$ réimplantées sur le malade. (maladies génétiques n'altérant qu'un seul organe dont les C sont facile à prélever , Ex: C du sang ou de moelle osseuse.)

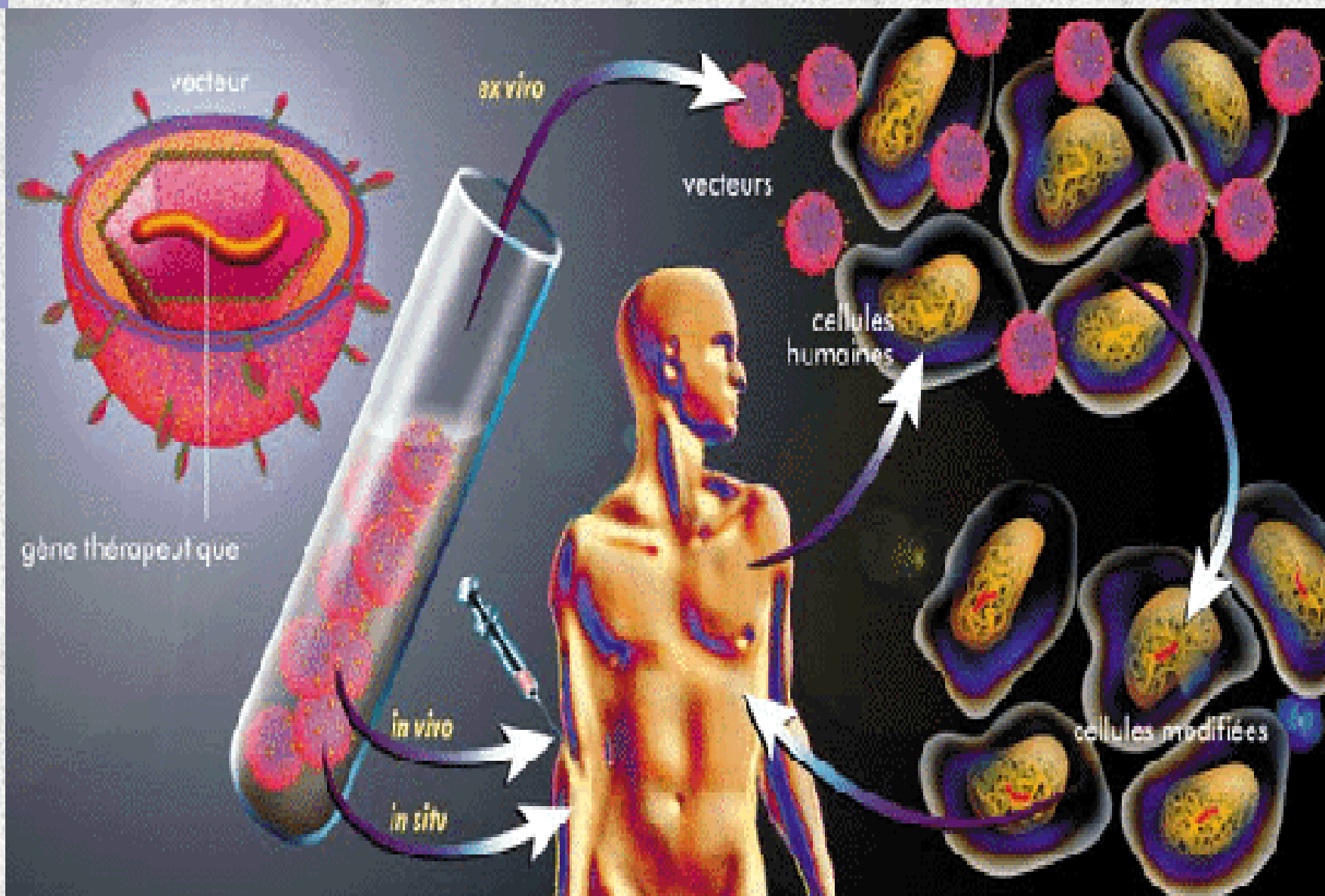


B/ Thérapie génique in vivo

administrer ds la circulation sanguine , et non à des ϕ en culture, un vecteur qui permet la libération du gène d'intérêt.

C/ Thérapie génique in situ

permet d'agir sur des organes dont on ne peut prélever les ϕ et les cultiver .(Ex mucoviscidose)



II – 5 EXEMPLES DE THERAPIE GENIQUE

- Correction d'un déficit génétiques

- ✓ ADA

- ✓ Mucoviscidose

- Cancers

- Maladies cardiovasculaires

- ...



CONCLUSION

La génothérapie est l'expérience thérapeutique de l'avenir .

outils peu nombreux et pas toujours très fiables, mais de nouveaux seront découverts
A notre époque beaucoup de facteurs entrent en jeu et diminuent le nombre de « candidats » à la thérapie génique :

Le coût,

les effets indésirables

et l'efficacité à longs termes

sont les grandes préoccupations des chercheurs.