

# Les techniques d'étude

## Du génome humain

### I\_ L'évolution de la génétique

La notion de maladie génétique était déjà connue autour de 1872 ; Mr Huntington avait remarqué que, pour certaines maladies, lorsque les parents étaient malades, les enfants l'étaient aussi.

En 1944, on démontre que l'ADN est le support de l'information génétique. On étudie en premier le génome des bactériophages, puis des bactéries, plus courts et plus simples.

#### A. Approches méthodologiques

Au fur-et-à mesure des découvertes, ainsi que des progrès techniques, différentes méthodes d'analyses du génome font leur apparition :

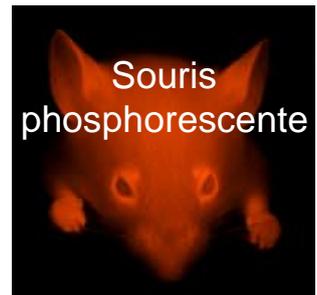
à en 1960, étude de chromosomes : observation et comparaison des caryotypes

à en 1965, génétique des cellules somatiques

à en 1970, génétique moléculaire

à en 1985, animaux transgéniques, knock-out : on peut maintenant créer des souris phosphorescentes

à en 1995, études *in silico*, post-génomique



#### B. Caractéristiques du génome humain

Les humains possèdent deux génomes distincts : un génome mitochondrial et un génome nucléaire. On a dénombré 30 % de séquences répétées, 60 % d'ADN non-codant (pour une protéine) et moins de 2 % d'ADN codant (pour une protéine).

Certains chercheurs dénomment l'ADN non-codant de l'ADN poubelle. En fait, la nature faisant rarement les choses au hasard, cet ADN aurait des fonctions de régulations très importantes pour la cellule.

Le génome humain est complexe mais pas plus qu'un autre génome. Il contient  $3,1 \times 10^9$  pb et on estime qu'il contient *25 000 gènes* codant apparemment pour un nombre très important de protéines.

On pensait que le nombre de gènes d'un organisme correspondait à sa complexité, et on estimait le nombre de gènes humains à 150 000 ; mais maintenant, on voit bien que la complexité n'a aucun rapport avec le nombre de gènes ( ou alors nous sommes moins complexes que nous le pensons ).

Il existe plusieurs milliers de maladies monogéniques humaines. On pense qu'un individu sain possède en moyenne 5 à 6 anomalies génétiques graves non exprimées.

Pour identifier la molécule responsable d'une pathologie génétique, il faut :

- q Cloner le gène responsable de la maladie
- q Connaître la séquence normale du gène
- q Mettre en évidence les mutations délétères

## C. Séquençage

Afin de faciliter les études sur le génome humain, une entreprise internationale appelée *Human Genome Project* s'est donnée pour but d'établir la séquence totale du génome humain. Le séquençage avait déjà été réussi pour *Escherichia Coli*, *Saccharomyces Cerevisiae* et *Drosophila Melanogaster*.

Un tel projet demande énormément de travail, de personnel, d'argent et de temps. Plusieurs centres de séquençage sont disséminés sur Terre. Le séquençage fut complété en 2003.

### Calculateurs de Celera



Un projet concurrent, nommé *Celera*, lancé par des sociétés pharmaceutiques privées, disposant de beaucoup plus de moyens que HGP a aussi tenté de séquençer le génome humain. Leur méthode était légèrement différente, mais ils disposaient de hangars remplis d'ordinateurs pour séquençer tous ces gènes. Ils possédaient à ce moment la deuxième puissance informatique sur Terre, après celle du Pentagone.

Seulement à la grande différence de HGP, leur but était de poser des brevets sur les gènes, afin de se servir du génome humain en tant que source d'argent. Heureusement une loi énoncée par [Bill Clinton](#) interdit maintenant de breveter des gènes. HGP publiait tous les jours son séquençage, tandis que les travaux de Celera n'ont pas été publiés, même s'ils existent ...

C'est ainsi qu'est née la bioinformatique. Des banques de données furent créées pour stocker toutes ces séquences, la première étant [GenBank](#), toujours consultable sur Internet. De nouveaux algorithmes furent inventés afin d'analyser ce génome ( ex : FASTA, BLAST ... ).

## II Stratégies de clonage d'un gène impliqué dans une pathologie humaine

à On ne parlera ici que des maladies monogéniques

Les humains sont déjà capable de cloner des animaux. Le premier mammifère fut cloné en 1997 ; c'était une chèvre qui s'appelait [Dolly](#). Cependant le clonage est excessivement difficile, et ce clone est mort peu de temps plus tard ...

On ne s'est bien évidemment pas arrêté là, et on a cloné beaucoup d'autres animaux, notamment des animaux perdus par de riches clients (chiens à leur mémère) désirant retrouver leur cher animal chéri... Attention, ce n'est pas le génome, mais ce que l'on a vécu qui nous rend si différents.

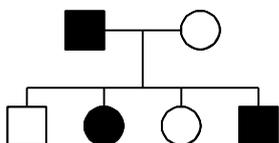
D'autres débordements ont aussi touché l'espèce humaine, puisque [Mr Hwang](#), surnommé le "pape du clonage" car il excellait dans cette matière, a été accusé d'exploiter certaines femmes en les payant pour leurs ovocytes et pour "couvrir" ses embryons ...

Enfin, un être humain aurait déjà été cloné par la religion de Raël, mais serait-il bien sage d'écouter ces illuminés ?

## A. Identification du gène

Pour identifier un gène, il faut connaître sa position sur le chromosome, son locus. Pour cela, le généticien dispose de plusieurs méthodes et outils.

I Familles malades :



Un arbre généalogique

En étudiant l'hérédité des maladies dans certaines familles, on peut identifier grâce au taux de recombinaison la position du gène sur le chromosome. Plus les familles sont grandes et nombreuses, plus l'étude est facile et précise.

| Anomalies chromosomiques :

Ces anomalies ont l'avantage d'être facilement repérées à l'aide d'un simple caryotype. Lorsque de telles pathologies ont des symptômes communs avec le gène recherché, on peut identifier plus facilement la position de ce gène.

| Enzymes de la génétique moléculaire :

Afin de manipuler et tester différentes combinaisons génétiques, dans la mesure du possible.

| Marqueurs polymorphes :

De petites séquences répétées un nombre variable de fois sont présentes sur l'ADN non-codant pour une protéine. Ces répétitions, appelées marqueurs, étant statistiquement différentes sur chaque chromosome, on peut ainsi différencier deux chromosomes en fonction de leurs marqueurs.

De plus, si on observe qu'un marqueur reste souvent associé au gène morbide au fil des générations, cela signifie que le marqueur est proche du gène, on peut ainsi le repérer de cette manière.

| Bioinformatique :

Le stockage et l'analyse de banques de données, telles que celles des séquences du génome ou de la carte des gènes, peuvent parfois permettre de situer un gène *in silico*.

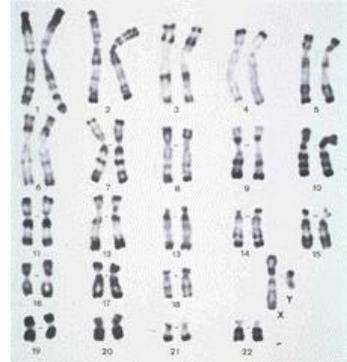
Ex : Le syndrome du X fragile associé à un fort retard mental est dû à une répétition trop élevée de **CGG** avant le gène FMR1, conduisant à son inactivation. Le nom de cette maladie est à l'origine de sa découverte : lorsque l'on effectue un caryotype, cette anomalie cause une cassure à son niveau.

Afin de faciliter les recherches, il faut d'abord sélectionner des gènes candidats qui satisfont à plusieurs paramètres :

- q Qui sont dans l'intervalle génétique du gène touché (= à peu près où se trouve le gène suspecté)
- q Qui ont des fonctions compatibles avec le phénotype malade
- q Avec un profil d'expression spatio-temporel compatible (= s'exprime dans les tissus problématiques et au même moment)
- q Dont des mutants du gène homologue d'une autre espèce ont un phénotype semblable
- q Pour les anomalies chromosomiques, qui se trouvent au niveau du point de cassure

Remarque : cette mutation doit être délétère, c'est-à-dire qu'elle entraîne une perte de fonction, et pas polymorphe, lorsqu'elle n'entraîne aucun changement ou donne un avantage.

Caryotype d'un humain  
( mâle sans anomalie chromosomique )



## B. Application des connaissances

Maintenant que l'on a isolé un gène responsable d'une maladie génétique, on déjà commencer certaines applications avant qu'un traitement ne soit ( s'il l'est un jour ) inventé.

### 1) Études du gène

On peut essayer de comprendre la fonction, le rôle, le profil d'expression spatio-temporel et la structure de la protéine codée pour guérir cette, voire d'autres, maladie.

### 2) Diagnostics

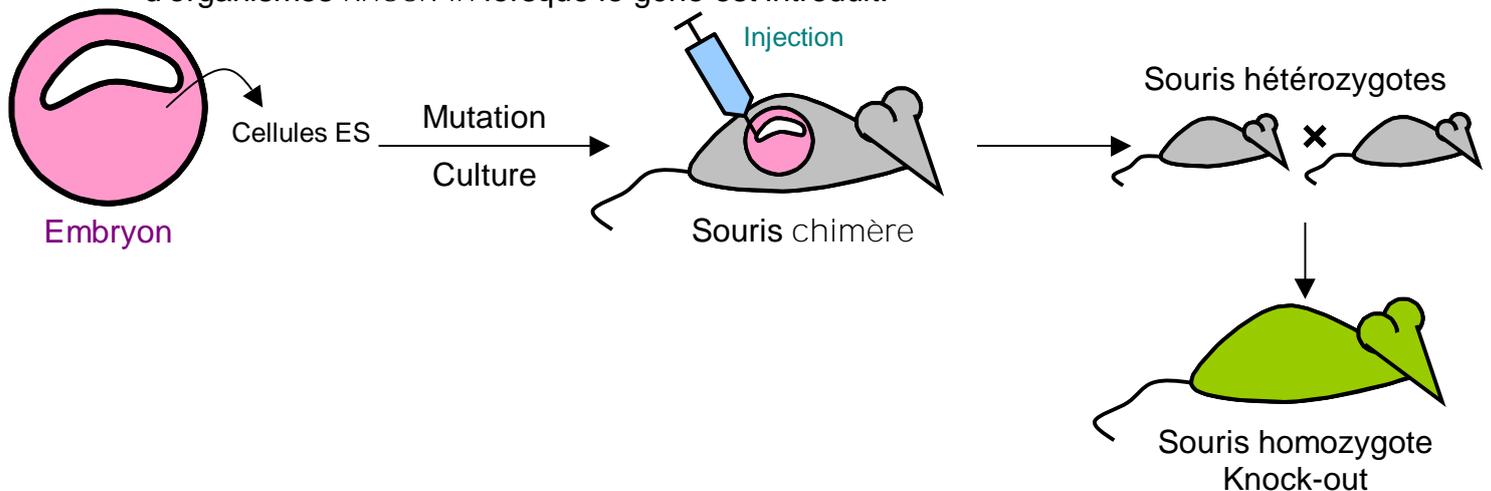
On peut maintenant évaluer la probabilité d'avoir un enfant malade chez les familles touchées pour leur faire connaître les risques ; c'est le conseil génétique.

On peut aussi diagnostiquer la maladie lorsque l'enfant est créé, mais pas encore né. On effectue un diagnostic prénatal par amniocentèse, mais avec certains risques ( 0,5 % d'avoir une fausse couche ).

Ou lorsque les embryons sont implantés par fécondation *in vitro*, on trie d'abord les embryons pour ne sélectionner que ceux qui ne sont pas porteurs de la maladie ; on dit que l'on fait un diagnostic pré-implantatoire. Malheureusement cette technique est très lourde et a peu de chances d'aboutir ...

### 3) Création d'organismes modèles

On peut aussi étudier en détails les conséquences de ce gène sur d'autres organismes. On parle d'organismes *knock-out* lorsqu'on provoque la mutation, ou d'organismes *knock-in* lorsque le gène est introduit.



## C. Thérapies basées sur la connaissance du gène

On pense toute de suite à la thérapie génique qui a engendré beaucoup d'espoirs, mais ce sont surtout des rêves. Après tout, c'est tout ce que peuvent vendre les médias ... En tout cas, pour l'instant cette technique n'est pas applicable à l'espèce humaine.

On prend en charge le malade, c'est-à-dire que l'on ne supprime pas la maladie, mais on essaie autant que possible de diminuer, voire d'éliminer les symptômes, avec comme but le bien-être du malade.

### 1) Substitution métabolique

On donne au malade un substrat qu'il ne peut pas fabriquer, ou on inactive un substrat toxique qu'il fabrique.

Ex : la phénylcétonurie est une maladie autosomale récessive qui ne permet plus au malade d'éliminer la Phénylalanine excessive. Elle engendre un retard mental. On lui prescrit de manger moins de protéines ; cette méthode limite grandement les effets de la maladie.

## 2) Transplantation

Lorsqu'un organe possède des anomalies, on peut parfois le remplacer. Le donneur doit être autant que possible compatible avec le malade afin de limiter les risques de réponse immunitaire.

Ex : Greffe de moelle osseuse lorsque le malade a des déficits immunitaires ou greffe de cœur ( lorsqu'il y en a qui sont disponibles ... ) si le cœur est mal formé.

Lorsqu'aucun donneur compatible de moelle osseuse n'a été trouvé, certaines familles font un autre enfant en espérant qu'il sera compatible ; on parle de "bébé médicament". On peut dire qu'ils aiment beaucoup le premier enfant, mais qu'en est-il du deuxième ?

## 3) Par chirurgie

Il est parfois possible de corriger chirurgicalement une maladie génétique, plus ou moins facilement.

## 4) Électrostimulation

En implantant des électrodes, on stimule certains nerfs, rendus inactifs par la maladie.

Ex : La dystonie de torsion entraîne chez le malade des mouvements incontrôlés dans tous les sens. En stimulant artificiellement une aire cérébrale qui contrôle le mouvement, des malades ont retrouvé des mouvements normaux.

## 5) Pharmacologie

On peut injecter périodiquement une protéine ( enzymes, hormone, etc ... ) à un malade afin d'améliorer son état. Peut-être qu'il sera possible plus tard d'insérer un implant qui injecterait automatiquement la protéine.

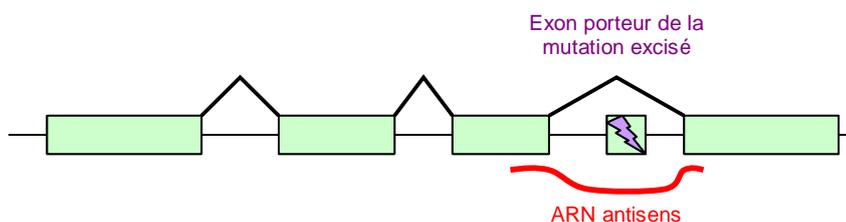
Ex : Les malades atteints d'un diabète insulino-dépendant s'injectent régulièrement de l'insuline par piqûres.

Ex : En injectant de l'hydroxyurée, on active l'expression du gène qui code pour l'hémoglobine du fœtus. On peut ainsi améliorer l'état des malades souffrant de la drépanocytose.

Ex : La myopathie de Duchenne est une maladie récessive autosomale qui ne permet plus au malade de fabriquer la dystrophine, une protéine qui stabilise la membrane des myocytes, désagrégeant peu à peu les muscles.

Différentes méthodes ont été testées :

- à Réactiver un gène inactif qui code pour une protéine proche :
  - \_ Activer la fabrication d'utrophine, normalement exprimée dans les synapses
- à Faire une bonne traduction malgré la mutation :
  - \_ Forcer les codons stop grâce à la gentamycine afin d'ignorer le codon stop induit par la mutation et augmenter le taux de bonnes protéines
  - \_ Modifier l'épissage en utilisant un ARN antisens. On excise ainsi l'exon portant la mutation ( qui est heureusement relativement petit et qui ne code pas pour une partie catalytique )



à Remplacer les cellules :

- \_ Insertion de cardiomyocytes

Un père voulant aider son enfant atteint de la myopathie a permis d'importer le Téléthon en France. Aujourd'hui, cet événement est une aide financière énorme pour la recherche.

### 6) Thérapie cellulaire substitutives

Lorsque c'est possible, on peut transformer des cellules souches en cellules spécialisées pour les réimplanter dans le malade.

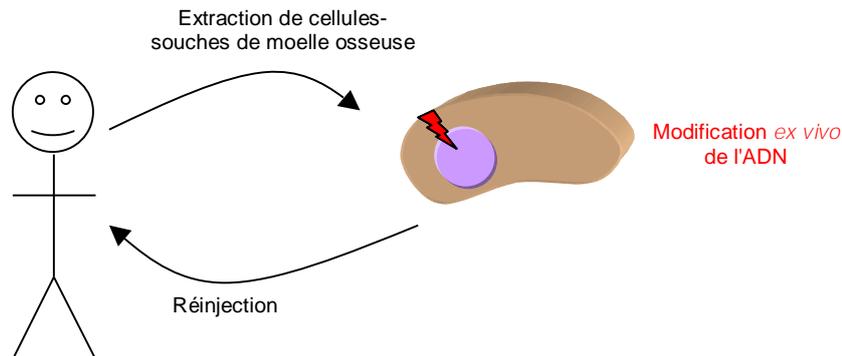
Ex : Greffe de cardiomyocytes dans le cœur du malade

### 7) Thérapie génique

La thérapie génique consiste à remplacer un gène défectueux par un gène sain, ou à ajouter un gène. Pour l'instant, les essais portant sur des animaux n'ont eu qu'un effet local et temporaire. Les problèmes les plus rencontrés pour utiliser cette méthode sont :

- \_ le vecteur doit être inactif
- \_ il doit s'insérer dans toutes les cellules à soigner, et seulement dans celles-ci
- \_ le gène ne doit pas être surexprimé
- \_ il ne doit pas y avoir de réponse immunitaire contre le vecteur ou la protéine

Une thérapie génique a déjà été effectuée sur des humains, et elle a fonctionné, en partie. Il fallait soigner une maladie génétique causant un déficit immunitaire sévère ( absence de cellules T et NK ). Les malades ne peuvent vivre que quelques mois à l'intérieur d'une "bulle". Le protocole était le suivant.



Malheureusement, des tumeurs sont apparues chez les patients traités. On pense que le gène s'est inséré près d'un gène proto-oncogène et l'a activé. On a effectivement observé que l'insertion s'était effectuée près de LMO-2.

Certaines solutions sont envisagées :

- à on utilise une séquence insulatrice, c'est-à-dire qui isole le gène
- à on ajoute un gène suicide qui permettra de détruire facilement les gènes en cas de tumeur
- à on cible l'intégration du transgène grâce à une intégrase.