

Université Akli Mohand Oulhadj - Bouira -
Tasdawit Akli Muhand Ulhag - Tubirett -
Faculté des Sciences de la Nature et
de la Vie et des Sciences de la Terre
Département des Sciences Biologiques



جامعة أكلي محند أولحاج
- البويرة -
كلية العلوم الطبيعية والحياة وعلوم الأرض
قسم العلوم البيولوجية

Master 1 : Biotechnologie Microbienne

Polycopie

Biotechnologie Génomique

Dr DJENADI K
k.djenadi@univ-bouira.dz

Table de matière

Avant-propos	
Table de matière	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre 01 « Pharmacogénomique et Pharmacogénétique »	
I. Concept et définition	2
II. L'utilisation de la pharmacogénétique.	2
III. Les applications de la pharmacogénomique.	4
IV. Le clonage thérapeutique	4
V. Série de TD 01	5
Chapitre 02 « Génétique et génomique humaine »	
I. Les macromolécules porteuses de l'information génétique « Le gène »	7
II. Eléments génétiques « Le chromosome et le plasmide »	8
II.1. Le chromosome	8
II.2. Les éléments génétiques extra-chromosomiques.	9
II.2.1. Le plasmide	9
II.2.2. Les génomes des organelles	10
II.2.3. Les éléments transposables	10
III. Méthodes de cartographie	10
III.1. Carte physique	10
III.1.1. Les cartes de restriction	10
III.1.2. Les cartes génétique	11
III.1.2.1. Les marqueurs physiques utilisés dans la cartographie génétique	12
III.1.3. Carte cytogénétique	14
IV. La recherche de gènes des maladies humaines, thérapie génique	14
IV.1. Le séquençage du génome et la recherche du gène.	14
IV.2. La thérapie génique	15
IV.2.1. L'introduire l'acide nucléique à l'intérieur de la cellule	16
IV.2.2. Les différentes stratégies de la thérapie génique	18
IV.2.2.1. Modification des séquences génomiques « Thérapie génique additive »	19

IV.2.2.2.	Modification des séquences génomiques « Thérapie génique additive »	19
IV.2.2.3.	Modulation de l'expression génomique	20
V.	Série de TD 02	21
	Chapitre 03 « Les usines unicellulaires et pluricellulaires »	
I.	Le lancement des usines unicellulaires et pluricellulaires	24
II.	Les protéines recombinantes	24
III.	Série de TD 03	25
	Liste des références bibliographiques	

Liste des figures

Figure n°01 : Contribution de la pharmacogénétique dans les paramètres de la pharmacocinétique	5
Figure n°02 : Illustration de la structure et des composants d'acide désoxyribonucléique (ADN) (Site 01)	7
Figure n°03 : Illustration des différents types d'acide ribonucléique (ARN) intervenant dans une cellule (Site 02)	8
Figure n°04 : Illustration des composants d'un chromosome d'une cellule eucaryote (Site 03)	9
Figure n°05 : La carte de restriction du plasmide p BR 322 (Site 04)	11
Figure n°06: De la carte génétique jusqu'à la séquence complète du génome humain (Site 05)	12
Figure n°07 : Illustration d'un polymorphisme de type (RFLP) (Site 06)	13

Liste des tableaux

Tableau n° I : Les différentes application de la thérapie génique

21

Avant-propos

La biotechnologie génomique se définit par l'ensemble des outils et techniques utilisées pour mettre en place un schéma de thérapie génie dans le but de traiter un dysfonctionnement physiologique chez un individu.

Ce polycopié pédagogique de l'unité découverte du premier semestre est destiné aux étudiants de première année cycle master en biotechnologie microbienne du département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre de l'Université Akli Mohand Oulhadj, Bouira. Ce polycopié est réalisé dans le but de consolider l'assimilation et la compréhension des cours du module « Biotechnologie Génomique » dispensés.

Ce cours s'articule sur trois chapitres qui vont permettre aux étudiants de Master 1 en spécialité biotechnologie microbienne de comprendre les deux domaines de la pharmacogénétique et la pharmacogénomique et comprendre l'effet et le devenir de ces molécules xénobiotiques. Par la suite définir les outils utilisés dans le domaine de la biotechnologie génomique à savoir la carte génétique et la thérapie génie. Enfin, mettre en place un procédé de production des usines unicellulaires et pluricellulaires.

Le premier chapitre intitulé « Pharmaco génomique et Pharmacogénétique » est scindé en un ensemble d'unités d'apprentissages qui va donner à nos étudiants la possibilité d'acquérir des compétences dans les deux disciplines de la pharmacogénomique et la pharmacogénétique, toute en se basant sur les notions de biologie moléculaire déjà acquises en cursus de licence. Ces compétences sont consolidées par des activités d'apprentissage présentées dans une série de TD 01.

Le second chapitre intitulé « Génétique et génomique humaine » comprend un ensemble d'unités d'apprentissages, à travers lesquelles l'étudiant va définir les différentes cartes physiques, génétiques et cytologiques utilisées dans le but de mettre en place une thérapie génie. Pour cela des prérequis en biologie moléculaire déjà acquises en cursus de licence. Ces compétences sont consolidées par des activités d'apprentissage présentées dans une série de TD 02.

Le troisième chapitre intitulé « Les usines unicellulaires et pluricellulaires » rassemble des unités d'apprentissages qui vont permettre à l'étudiant de dresser un schéma de production des protéines à usage pharmaceutique toute en se basant sur les notions de biologie moléculaire et de biochimie déjà acquises en cursus de licence. Ces compétences sont consolidées par des activités d'apprentissage présentées dans une série de TD 03.

Durant le semestre, les apprentissages présentés sont soumis à des évaluations. Ces dernières vont se faire à travers d'un examen final sur table (EMD) (60%) et une évaluation continue et régulière qui se base sur les évaluations continues lors des séances de TD.

Introduction

Les cellules sont des unités fonctionnelles du monde vivant : rassemblent des macromolécules et les modifient pour créer de nouvelles cellules. Ces cellules stockent, modifient et exploitent des gènes pour produire des molécules fonctionnelles en réponse à des stress ou à d'autres fonctions. Cependant, ces cellules peuvent subir des modifications au niveau de leurs gènes ce qui va induire un dysfonctionnement ou déséquilibres au niveau de la physiologie l'individu.

Face à cette situation, les scientifiques ont mise en place un ensemble de technique génétique et cellulaire nommée la biotechnologie génomique. L'objectif de ces méthodes est de restaurer l'harmonie dans le corps d'un organisme vivant. Elles acceptent l'isolement, la manipulation de l'ADN et la régulation de son activité. Le recours à des techniques in vitro, notamment le clonage moléculaire, qui implique l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés, est désigné sous le terme de génie génétique.

Le génie génétique s'oriente de l'utilisation de la théorie vers des applications pratiques. Cette dernière permet à aboutir à l'application d'une thérapie génique. La thérapie génique consiste à traiter des maladies provoquées par un gène défaillant en insérant des copies fonctionnelles de ce gène.

Ce module comprend trois chapitres. Il vise à vous familiariser avec l'application d'outils de biologie moléculaire et de matériel génétique dans le domaine clinique humain, en vue du développement de traitements pour diverses affections et anomalies. Comme il vise notamment à comprendre le domaine de la pharmacogénomique et la pharma génétique et en fin aboutir à la formation des usines unicellulaires et pluricellulaires.

Chapitre 01 Pharmacogénétique et pharmacogénomique

Les médicaments ou bien les xénobiotiques, font référence aux composés chimiques étrangers à l'organisme auxquels les individus sont régulièrement confrontés par divers moyens. La réponse aux médicaments présente une considérable diversité inter-individuelle, que ce soit en ce qui concerne leur efficacité ou leur toxicité. Cette diversité est en partie attribuable à de multiples facteurs physiopathologiques, notamment l'âge, le sexe, la grossesse, les affections concomitantes, les fonctions hépatiques et rénales des patients, ainsi qu'à des éléments environnementaux comme la nutrition, la prise simultanée de médicaments, le tabagisme, etc.

Néanmoins, grâce aux avancées technologiques, les recherches moléculaires sur les gènes ont mis en lumière que les anomalies touchant les gènes responsables de la distribution des médicaments, de leur métabolisme, ou encore ceux codant pour leurs cibles thérapeutiques, telles que les récepteurs, jouent un rôle fondamental dans les fluctuations d'efficacité et de toxicité des composés médicamenteux. Ces avancées récentes ont donné naissance à de nouvelles disciplines à savoir la pharmacogénétique et la pharmacogénomique. Ces dernières vont nous permettre de bien comprendre l'effet et le devenir de ces molécules xénobiotiques.

I. Concept et définition

La pharmacogénétique est une discipline qui se spécialise dans l'étude de l'impact des gènes et de leurs variations sur la réaction aux médicaments.

En revanche, la pharmacogénomique se concentre sur l'exploration des facteurs génétiques qui déterminent la réaction d'une personne à un médicament.

La pharmacogénétique et la pharmacogénomique sont des domaines multidisciplinaires qui intègrent des aspects de la pharmacologie, de la pharmacocinétique, de la biochimie, de la génétique et de la biologie moléculaire. L'objectif final de la pharmacogénétique est de créer des tests simples qui permettront de reconnaître les personnes susceptibles d'exprimer des réponses anormales aux médicaments, idéalement avant leur administration. Parmi les variations génétiques, les plus étudiées concernent celles qui influencent les enzymes responsables du métabolisme des médicaments et les protéines responsables de leur transport. En effet, ces substances sont de caractère hydrophobe et nécessitent qu'elles soient transformées en molécules hydrophiles pour qu'elles soient éliminées plus aisément par la bile ou les urines. Et la pharmacogénomique vise à adapter le traitement au patient.

II. L'utilisation de la pharmacogénétique.

Suite à une ingestion par voie orale, les médicaments nécessitent d'entrer à l'intérieur de la circulation sanguine et rejoindre leur destination, en traversant la barrière intestinale où se trouvent des transporteurs conçus pour les éliminer. Ensuite, le métabolisme cellulaire, principalement situé

dans le foie, est géré par divers systèmes enzymatiques à savoir les enzymes de la phase I et ceux de la phase II. Les enzymes de la phase I, appartenant à la grande famille des cytochromes P 450, et les enzymes de la phase II, qui sont des transférases responsables de réactions de conjugaison, contribuent à rendre les métabolites plus hydrophiles. Finalement, pour être excrétés à l'extérieur de la cellule, ces métabolites conjugués nécessitent d'être transportés à travers la membrane cellulaire par des protéines de la phase III, qui incluent les protéines ABC (ATP-Binding Cassette) et les protéines SLC (Solute Carrier).

Il convient de souligner que la plupart des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments, comme le cytochrome P 450, sont présentes de manière ubiquitaire, c'est-à-dire dans divers tissus de l'organisme. Les cytochromes P 450 affectent la disponibilité des agents thérapeutiques et participent à la création de métabolites, dont la production *in situ* des tissus peut argumenter la toxicité spécifique à ces tissus. En effet, les réactions métaboliques aboutissent généralement à l'inactivation du xénobiotique, mais il arrive parfois qu'elles engendrent un métabolite plus actif, voire plus toxique, que les molécules d'origine. La balance entre la création de métabolites toxiques ou non toxiques dans un tissu dépend, au moins en partie, de la composition en enzymes exprimées dans ce tissu.

Les variations génétiques qui influencent l'expression ou l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments se manifestent au sein de la population générale sous forme de différents phénotypes métaboliques. Ces phénotypes définissent au moins deux groupes d'individus : les métaboliseurs lents (ML), caractérisés par une activité enzymatique réduite, et les métaboliseurs rapides (MR), qui ont une activité enzymatique normale. Dans certains cas, on observe également des métaboliseurs ultra-rapides (MUR), avec une activité enzymatique augmentée, ainsi que des métaboliseurs intermédiaires (MI).

La distribution des divers phénotypes varie selon l'enzyme considérée, et même au sein d'une même enzyme, elle peut varier selon l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées. L'évaluation du phénotype métabolique d'un individu peut être réalisée à l'aide de deux méthodes, à savoir le phénotypage ou le génotypage.

Les approches de phénotypage se basent soit sur la détermination directe de l'activité enzymatique, soit plus fréquemment sur l'administration d'un substrat-test, suivie de la quantification des résidus de substrat et/ou de leurs métabolites. Néanmoins, la méthode la plus courante et la plus rapide est le génotypage, qui repose sur l'analyse d'un échantillon d'ADN.

La pharmacogénétique repose sur des modifications telles que l'insertion ou la suppression de bases, mais elle se base en grande partie sur les changements ponctuels de nucléotides (SNPs), qui représentent environ 10 % de la variabilité génétique du génome humain. Ces recherches permettent

aux praticiens de prédire et de prévenir les effets indésirables chez leurs patients, qui étaient auparavant considérés comme inévitables lors des traitements médicamenteux. Ainsi, cela contribue à performer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de nombreuses thérapies.

III. Les applications de la pharmacogénomique.

Les applications de la pharmacogénomique peuvent obéir à deux approches distinctes : approche génotypique à phénotypique et une approche phénotypique à génotypique.

L'approche génotypique à phénotypique se base sur l'identification du gène qui est impliqué dans la modélisation de la réponse au médicament. Par la suite le scientifique doit identifier les variations présentes sur la séquence de l'ADN au sien d'une population. Après rechercher le phénotype qui est associé avec la variation de la séquence. Et enfin dresser une confirmation de la pertinence clinique de l'association génotype- phénotype.

Dans cette approche, on fait appel à deux concepts de la pharmacologie : la pharmacodynamique et la pharmacocinétique. La pharmacodynamique mesure l'effet d'un médicament dans l'organisme. Cet effet dépend de la dose du médicament reçu. La pharmacocinétique se penche sur le parcours qu'effectue une substance active (un xénobiotique) contenue dans un médicament après avoir été administrée à l'organisme, en passant par les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme, et enfin d'excrétion du principe actif ainsi que de ses métabolites à travers les membranes.

Et dans l'approche phénotypique à génotypique, on procède en premier à l'identification du phénotype qui présente une variation significative. Puis rechercher les gènes qui peuvent expliquer cette variation. Par la suite, caractériser la variation génétique et vérifier son association avec le phénotype et enfin confirmer la base génétique proposée pour la variation et sa pertinence clinique.

IV. Le clonage thérapeutique

En 1996, les premiers résultats du premier clonage reproductif ont été dévoilés avec la célèbre brebis "Dolly", qui a été produite par reproduction asexuée. La méthode implique le transfert du noyau d'une cellule somatique adulte vers un ovule (cellule germinale femelle) à partir duquel le noyau d'origine a été retiré. Ensuite, le noyau transféré subit une "reprogrammation" qui lui confère la capacité de diriger le développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste.

Après cela, il est implanté dans l'utérus d'une brebis porteuse où il continue à se développer jusqu'à ce qu'un clone soit formé, c'est-à-dire une brebis avec un patrimoine génétique identique à celui de la brebis adulte dont la cellule somatique était originaire. Bien que cette technique demeure révolutionnaire, les auteurs de cette expérience continuent d'insister sur le taux élevé d'échecs associés à la technique, ainsi que sur les anomalies qui peuvent survenir dans certains organes des clones obtenus, en plus du vieillissement prématuré observé chez les animaux clonés.

Ensuite, la technique de clonage reproductif a été appliquée à diverses autres espèces animales, notamment la vache, la truie et la souris, mais les tentatives de clonage reproductif chez les primates ont connu des difficultés. Ces avancées technologiques ont engendré une autre variante du clonage, connue sous le nom de clonage thérapeutique. Le terme "clonage thérapeutique" est une expression ambiguë et incorrecte qui fait référence à l'utilisation de cellules souches pluripotentes dérivées de blastocystes humains obtenus par le transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovule préalablement vidé de son contenu nucléaire. L'objectif est d'exploiter les facultés de différenciation multiple des cellules souches embryonnaires ainsi créées afin de restaurer les tissus adultes malades (maladie de Parkinson, diabète, cancers, infarctus, ...).

Les sources de cellules souches adultes sont principalement le sang de cordon ombilical, le sang lui-même, mais surtout la moelle osseuse.

Que les cellules souches proviennent de sources embryonnaires ou adultes, elles ne suscitent pas de préoccupations liées au rejet immunitaire, car elles seront parfaitement acceptées par le système immunitaire du receveur en raison de leur partage du même patrimoine génétique. Il est clair que l'objectif dans l'utilisation des cellules souches adultes ou des cellules souches embryonnaires obtenues par transfert nucléaire réside dans les avantages thérapeutiques résultant de cette "tolérance" parfaite.

V. Série de TD 01 :

Enoncé : La pharmacogénétique et la pharmacogénomique sont des thématiques pluridisciplinaires, qui sont très réponsus dans le domaine pharmaceutique. Des études chez des jumeaux ont montré que la demi-vie d'élimination d'un médicament était un caractère héritable. La figure ci-dessous illustre que La demi-vie de la molécule antipyrine est plus concluante chez les géméaux identiques (Monozygote) en comparaison avec les géméaux fraternels (Dizygote) (Faux géméaux).

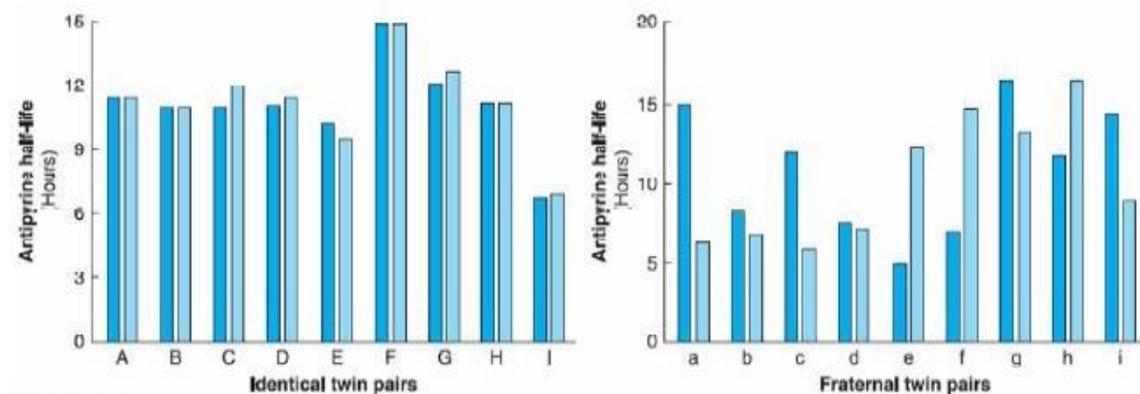


Figure 01 : Contribution de la pharmacogénétique dans les paramètres de la pharmacocinétique
(Redraw from data in Vesell and Page, 1968).

1. Après avoir commentez les deux histogrammes, nommez les deux sous disciplines qui permettent de suivre la dynamique et la cinétique du métabolisme des molécules xénobiotiques
2. Quelle sont les informations qu'on peut avoir de ces deux histogrammes.
3. Nommez les différentes phases du métabolisme intracellulaires de ces molécules xénobiotiques.
4. Enumérez les différentes causes de variabilité dans la réponse aux médicaments.

Chapitre 2 Génétique et Génomique humaine

La génomique est une discipline de la biologie moderne. Elle a pour axe d'étude le fonctionnement d'un organisme, d'un organe, d'une pathologie, etc. à l'échelle plus large qu'au niveau du gène, elle explore aussi le génome. La génomique se divise en deux branches distinctes : la génomique structurale, qui repose sur le séquençage complet du génome, et La génomique fonctionnelle a pour but d'élucider la fonction et l'expression des gènes qui ont été séquencés en analysant de manière détaillée le transcriptome et le protéome.

I. Les macromolécules porteuses de l'information génétique « Le gène »

Le gène est une entité fonctionnelle de l'information génétique présente dans tous les organismes vivants. La compréhension du fonctionnement du gène est essentielle pour appréhender la structure, la fonction et le comportement des cellules. Non seulement mais avoir des informations sur le transfert du gène permet de comprendre au mieux le fonctionnement et la biologie d'une cellule ou d'un virus.

Dans la cellule eucaryote ou procaryote les gènes sont composés d'acide désoxyribonucléique (ADN), une macromolécule composée de séquences de bases puriques (AdénineGuanine) et pyrimidiques (ThymineetCytosine). La structure de la chaîne d'ADN est constituée d'une séquence répétée d'un phosphate et d'un désoxyribose, auxquels l'une des quatre bases azotées est attachée (Figure 02).

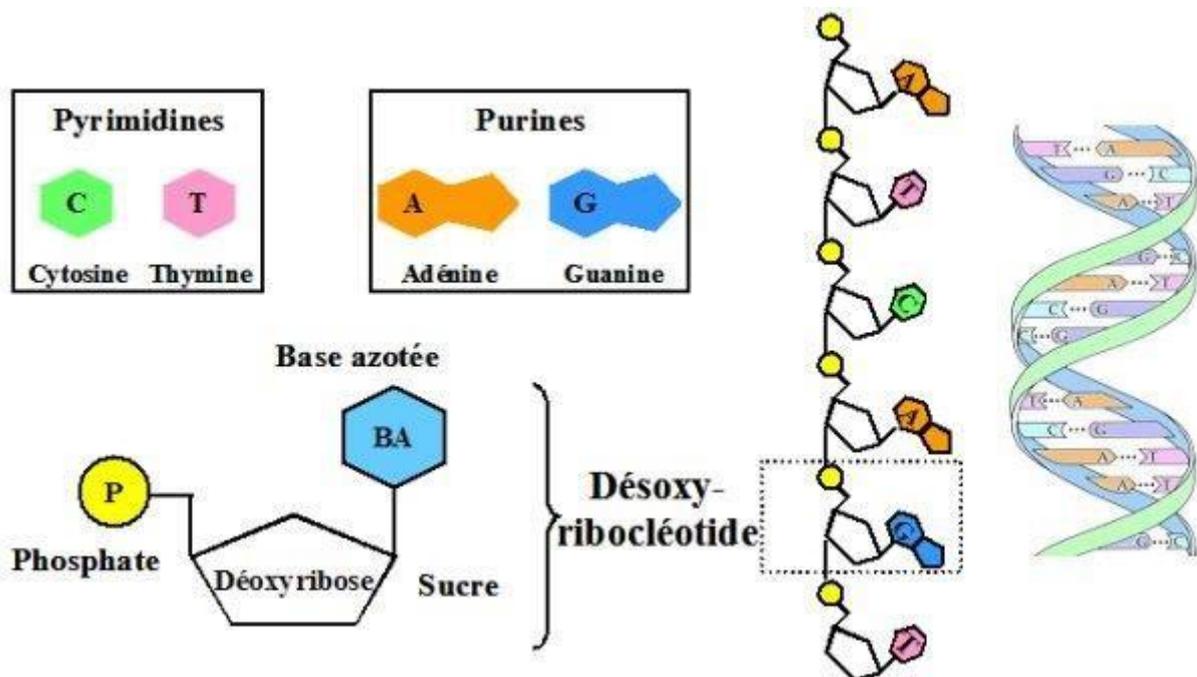


Figure n°02 : Illustration de la structure et des composants d'acide désoxyribonucléique (ADN) (Site 01)

L'arsenal génétique est transféré aux acides ribonucléiques (ARN). Les acides ribonucléiques (ARN) sont les macromolécules les plus abondantes après les protéines dans une cellule en phase de croissance. Des milliers de ribosomes, composés d'ARN et de protéines, sont responsables de la synthèse de divers types de protéines. Par ailleurs, dans le cytoplasme, on observe une abondance d'ARN messager et d'ARN de transfert. Ils revêtent une importance capitale dans le processus de synthèse des protéines. Les étapes moléculaires sous-tendant la transmission des informations génétiques se déroulent en trois phases distinctes : la réplication, la transcription et la traduction (Figure 03).

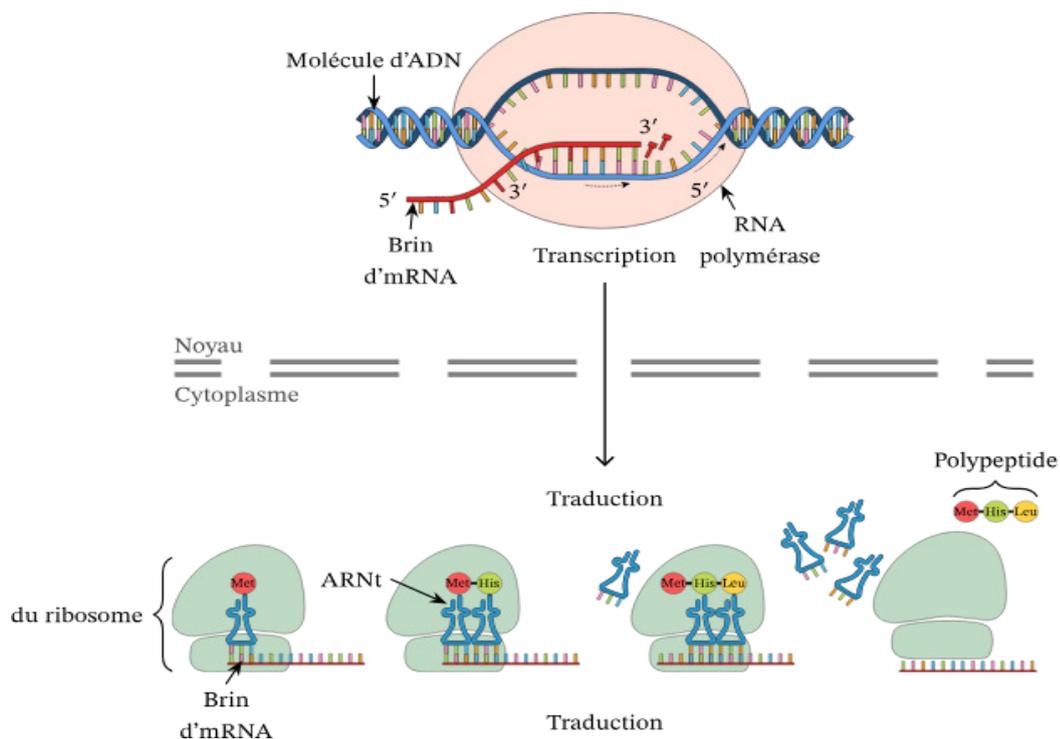


Figure n°03 : Illustration des différents types d'acide ribonucléique (ARN) intervenant dans une cellule (Site 02)

II. Eléments génétiques « Le chromosome et le plasmide »

Les éléments génétiques sont des structures qui renferment les informations génétiques, tandis que le génome englobe l'ensemble des gènes présents dans une cellule ou un virus.

II.1. Le chromosome

Dans les procaryotes typiques, un seul chromosome circulaire est généralement présent, renfermant tous les gènes de la cellule. Néanmoins, certaines bactéries et *Archaea* peuvent également posséder, en plus du chromosome, un plasmide.

Chez les eucaryotes, le génome est constitué de plusieurs chromosomes linéaires. Chaque chromosome linéaire des eucaryotes présente une séquence appelée télomère à chaque extrémité, ainsi qu'une région centrale connue sous le nom de centromère. Les centromères ont une importance cruciale dans la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire, tandis que les télomères jouent un rôle essentiel dans le processus de réplication des molécules d'ADN linéaire.

A l'opposé de l'ADN procaryote, le génome humain porte un nombre important de séquences d'ADN supplémentaires (Intron) ou des séquences répétées. Les eucaryotes possèdent également plusieurs copies de certains gènes, bien plus nombreuses que chez les procaryotes. Le chromosome renferme des gènes dits "de ménage" qui sont essentiels au bon fonctionnement de la cellule (Figure n°03).

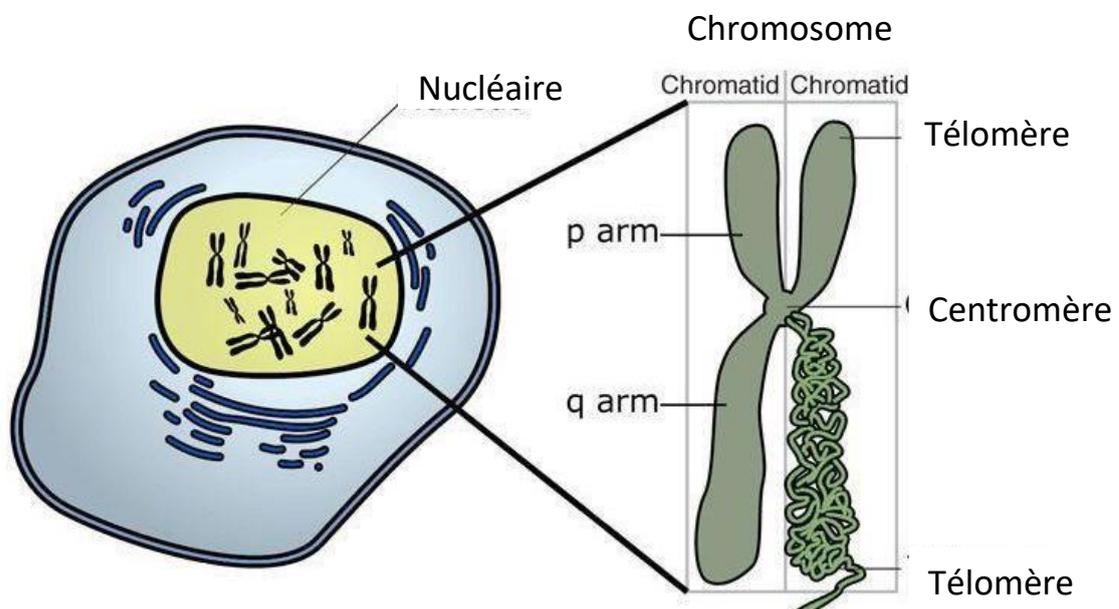


Figure n°04 : Illustration des composant d'un chromosome d'une cellule eucaryote (Site 03)

II.2. Les éléments génétiques extra-chromosomiques.

Outre le chromosome, les cellules peuvent renfermer d'autres composants génétiques tels que les plasmides, les génomes des organites (comme les mitochondries et les chloroplastes), ainsi que les éléments transposables.

II.2.1. Le plasmide

Le plasmide est un élément génétique extra-chromosomique, qu'il soit sous forme d'ADN double brin circulaire ou linéaire, renferme des gènes qui codent pour des protéines, conférant ainsi à la cellule hôte des caractéristiques spécifiques, comme la résistance aux antibiotiques.

II.2.2. Les génomes des organelles

Dans la cellule eucaryote, les organelles qui présentent une grande proportion, qui sont les mitochondries et les chloroplastes. Ces derniers contiennent chacun un petit chromosome qui porte tous l'arsenal génétique essentiel pour la synthèse, traduction et la formation des protéines fonctionnelles.

II.2.3. Les éléments transposables

Caractérisée par des molécules d'ADN mobiles, cette composante revêt une grande importance dans la diversité génétique. Parmi les procaryotes, on peut identifier des séquences d'insertion, des transposons et des bactériophages.

III. Méthodes de cartographie

Actuellement, la recherche en génétique consiste à explorer comment les gènes utilisent les organismes pour se perpétuer à travers les individus, les espèces et les populations.

L'un des buts essentiels de la génétique moléculaire est de définir les gènes pour pouvoir en définir la structure et la fonction de leurs produits et par la suite comprendre la régulation et l'évolution du gène dans un génome. Par la suite vient la biotechnologie génomique qui utilise les informations obtenues au profil de l'humain, industrie, médecine, pharmaceutique, ...). Grâce à la génétique classique plus de 2000 maladies héréditaires sont décrites et localisées sur le chromosome X. La localisation des gènes nous permet non seulement de les reproduire par clonage, mais aussi de simplifier les processus d'incorporation de nouveaux traits dans des espèces agronomiques ou pharmaceutiques. On distingue trois types de cartes génomiques : carte physique, carte génique, carte cytogénétique.

III.1. Carte physique

Elle repose sur l'alignement des clones le long du génome. Elle permet d'établir les distances physiques entre les gènes. Ces positions sont exprimées en Kilo bases. La carte de restriction est l'une des cartes physiques la plus utilisées.

III.1.1. Les cartes de restriction

Elle indique la séquence des sites de restriction le long du brin d'ADN ainsi que la taille des fragments qui en résulte. (Figure n° 05). La schématisation d'une carte de restriction nous permet d'avoir la répartition des séquences le long du génome après avoir élaboré une digestion de la séquence par des enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des protéines produites par des bactéries dans le but de se défendre contre les infections virales. Elles effectuent des coupures dans l'ADN viral à des sites spécifiques appelés sites de restriction. Ces enzymes sont

affiliées aux endonucléases ; Des enzymes capables de scinder les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur de la chaîne d'un acide nucléique, exemple : EcoRI, Bam HI, Hind III. Après une digestion enzymatique d'un gène de petite taille par plusieurs enzymes on peut avoir un ensemble de clones chevauchants, une fois organisé à l'aide d'une banque de données, on peut avoir une carte de restriction.

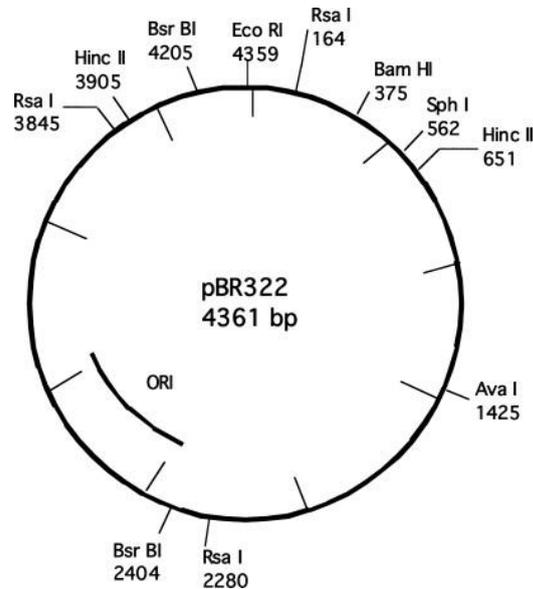


Figure n°05 : La carte de restriction du plasmide p BR 322 (Site 04)

III.1.2. La carte génétique

Il s'agit d'une carte de mutations ou d'allèles qui peuvent être identifiés biologiquement par le biais de phénotypes distincts, et qui sont espacés les uns des autres en termes de distance génétique (Figure 05). Elle permet d'établir les distances génétiques entre les marqueurs en exploitant le pourcentage de recombinaison à la méiose. Dans la carte génétique les positions sont des distances de recombinaisons exprimées en centimorgan (cM).

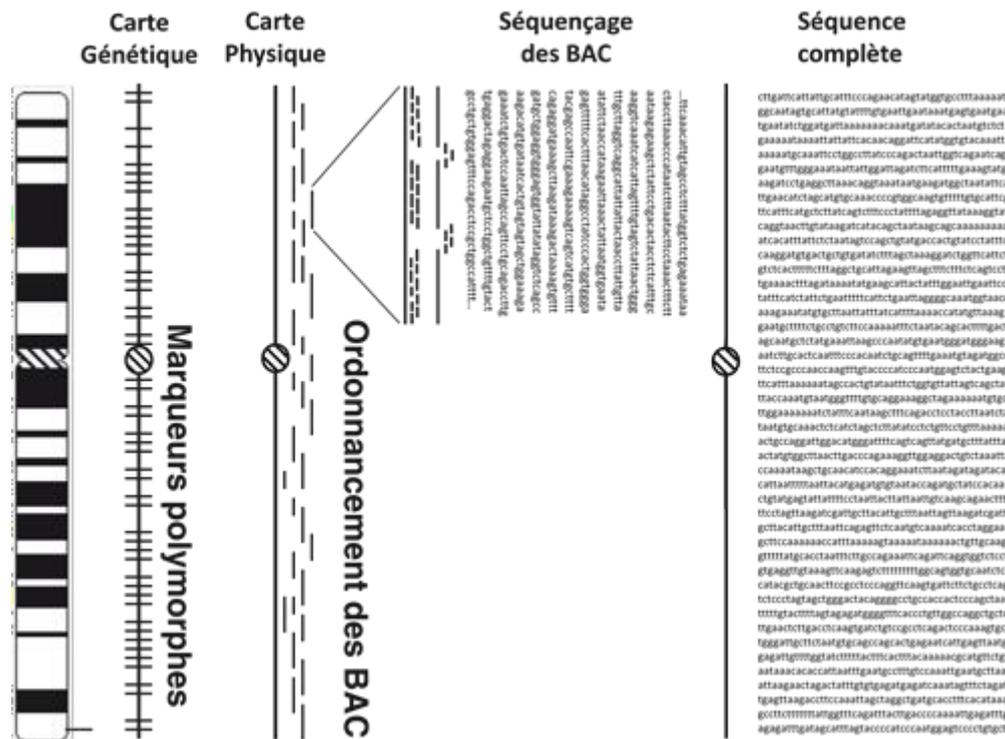


Figure n°06 : De la carte génétique jusqu'au séquence complète du génome humain (Site 05)

III.1.2.1. Les marqueurs physiques utilisés dans la cartographie génétique.

L'identification de ces marqueurs est réalisée en utilisant une collection aléatoire de fragments clonés provenant du génome. Ces fragments, également appelés sondes, sont utilisés pour détecter des mutations dans l'ADN d'une espèce. Ces sondes sont utilisées pour repérer les mutations sur un locus spécifique (allèles), et grâce à une hybridation *in situ*, nous pouvons les localiser sur une carte cytogénétique. De plus, nous pouvons suivre la ségrégation des allèles identifiés à l'aide de ces sondes.

Les marqueurs physiques les plus fréquemment employés incluent le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), les microsatellites et les polymorphismes mononucléotidiques (Single Nucleotide Polymorphism ou SNPs).

a) Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Ce principe consiste à extraire, à partir d'une bande de restriction, des séquences génomiques qui sont ensuite utilisées comme sondes pour hybridation avec les empreintes génomiques de différents individus. Une grande partie de ces sondes révèle un polymorphisme des fragments de restriction hybrides. Grâce à cette technique, il est possible d'attribuer rapidement n'importe quelle nouvelle sonde anonyme à un chromosome par le biais de l'hybridation *in situ*. Par le biais de cette méthode, il a été facile de repérer l'emplacement de gènes responsables de plusieurs maladies héréditaires, qu'elles soient plus ou moins courantes

(comme la mucoviscidose, par exemple), ainsi que de dresser rapidement des cartes génétiques de caractères agronomiques d'intérêt. (Figure n° 06).

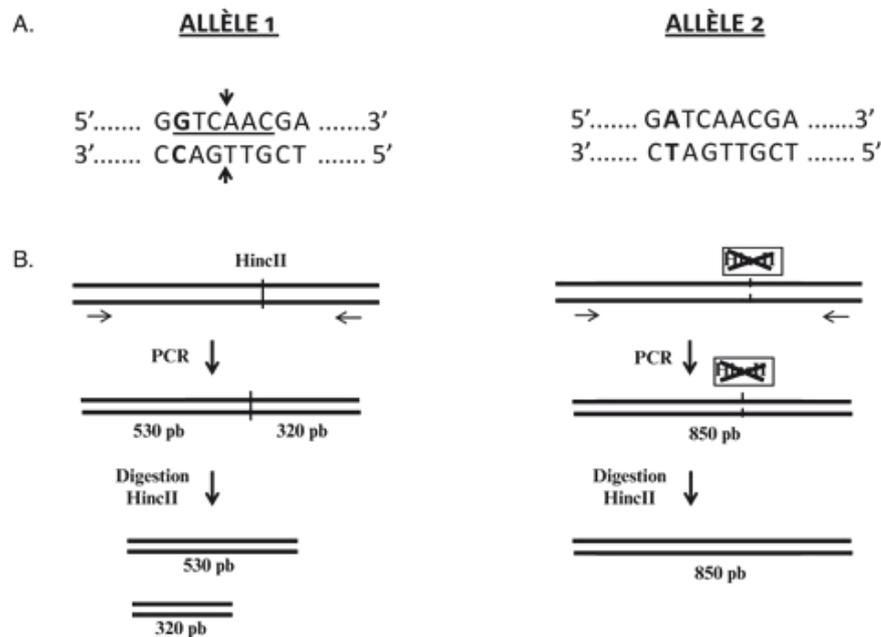


Figure n°07 : Illustration d'un polymorphisme de type (RFLP) (Site 06)

b) Les microsatellites

Un marqueur polymorphe se compose de courtes séquences répétées, dont la longueur peut varier au sein de la population, et qui sont insérées au sein de séquences uniques conservées. Les microsatellites sont caractérisés par des répétitions monotones de di-, tri-, ou tétranucléotides. La position de ces répétitions est généralement stable au sein d'une espèce, mais le nombre de répétitions varie d'un individu à un autre, créant ainsi une diversité d'allèles distincts à un locus spécifique. L'identification d'un microsatellite est communément appelée la technique d'amplification des microsatellites ou Simple Sequence Length Polymorphism. Elle offre une meilleure efficacité que la RFLP, permettant de détecter un polymorphisme plus prononcé et distribué de manière aléatoire. Cette méthode repose initialement sur le criblage d'une séquence spécifique à l'aide d'une sonde, suivie du séquençage des régions uniques voisines. Ensuite, des oligonucléotides dérivés de ces séquences uniques, encadrant la répétition, sont préparés. Enfin, une PCR est réalisée sur un ensemble d'individus afin de détecter le polymorphisme.

Une fois qu'un locus polymorphe a été identifié, on procède à la recherche d'une association entre ce polymorphisme et le caractère phénotype.

c) Polymorphisme mononucléotidique (Single Nucleotide Polymorphism)(SNPs).

Définit comme la méthode prédominante de nos jours. Elle se repose sur la détection de mutations ponctuelles qui se répartissent au sein de la même espèce. Cette méthode comporte deux étapes : le séquençage direct et l'hybridation sur une puce à ADN. Lors du séquençage direct, diverses régions sont amplifiées par PCR en utilisant des paires d'oligonucléotides spécifiques pour chaque région examinée. Les produits de PCR sont ensuite soumis à une opération de séquençage. En séquençant la même région chez deux individus, on obtient instantanément toutes les variantes possibles du polymorphisme. En ce qui concerne l'hybridation sur puce à ADN, le processus est le suivant : lors de l'analyse de SNPs au sein d'une population, on dispose côte à côte deux à quatre oligonucléotides correspondant à chaque allèle présent. Pour chaque individu, toutes les régions susceptibles de contenir des SNPs sont amplifiées par PCR, marquées avec des nucléotides fluorescents, puis hybridées à la puce. Ainsi, un profil allélique est obtenu pour chaque SNP présent sur la puce, caractérisant l'individu. Ensuite, une comparaison est effectuée entre les différents individus. Si certains ensembles de SNPs sont régulièrement hérités en association avec le trait recherché, ils peuvent être génétiquement liés à un gène de susceptibilité.

III.1.3. Carte cytogénétique :

Elle est dressée sur la base d'une comparaison entre les caryotypes sur le chromosome en métaphase chez des individus normaux et mutants. Après fixation des chromosomes, on effectue un traitement avec les protéases pour éliminer les chromosomes des protéines de surfaces en suite en procède à une décoloration par des agents intercadents ou non (Quinacrine, Giemsa). Suivant l'intensité de la coloration on peut facilement définir des réarrangements (inversion, délétion, duplication, ...), associé parfois à certaines mutations ; Chaque bande chromosomique qui correspond à la position représente environ 10^4 Kpb et peut correspondre au moyenne 10 à 100 gènes.

IV. La recherche de gènes des maladies humaines, thérapie génique

IV.1. Le séquençage du génome et la recherche du gène.

Le séquençage, également connu sous le nom de méthode des didésoxyribonucléotides, a été développé au laboratoire de Fred Sanger à Cambridge, en Angleterre. Actuellement, cette méthode est largement utilisée pour la séquence de l'ADN. Elle implique l'extension d'un brin d'ADN à partir d'une amorce grâce à l'ADN polymérase, en utilisant un second brin d'ADN comme modèle. Ce processus d'allongement se déroule en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), qui sont les monomères utilisés par la polymérase, ainsi que d'un analogue didésoxyribonucléotide (ddNTP) agissant

comme un terminateur de chaîne. En raison de l'incorporation sélective de l'analogue par la polymérase, on obtient un mélange de fragments d'ADN se terminant de manière sélective aux positions correspondant au nucléotide choisi.

Le principe de la méthode de séquençage est le suivant : quatre réactions parallèles sont réalisées, chacune utilisant l'un des quatre ddNTP. Ensuite, les fragments produits sont séparés par électrophorèse. Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase, en particulier pour les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Ce marqueur est attaché à l'une de leurs deux extrémités, soit en 5', sur l'amorce de séquençage, soit en 3', sur le didésoxyribonucléotide terminateur.

Les séquenceurs automatiques modernes font usage d'un système de détection in situ durant l'électrophorèse. Un laser émettant dans la plage d'absorption du fluorophore est dirigé à travers le gel. Au cours de la migration, lorsque des bandes d'ADN se déplacent devant le faisceau laser, elles émettent un signal de fluorescence. Ce signal est capté par une photodiode placée en face du gel. Il est ensuite amplifié et transmis à un ordinateur de contrôle, où il est analysé par un logiciel spécialisé.

IV.2. La thérapie génique

La thérapie génique est une approche qui consiste en un ensemble de techniques visant à extraire des acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir d'une cellule spécifique. Son objectif est de modifier l'expression des gènes chez un individu pour traiter directement les causes d'une maladie d'origine génétique.

L'origine de la thérapie génique remonte à la mise en place de la technologie de l'ADN recombinant. Cette avancée a permis l'isolement des gènes, la caractérisation de leurs expressions, et l'identification de mutations liées à des maladies humaines. Dans ses débuts, la thérapie génique était principalement utilisée lorsque le patient n'était pas éligible à une greffe allogénique de cellules ou de tissus fonctionnels. De nos jours, la thérapie génique s'oriente vers d'autres objectifs, notamment l'introduction d'un gène suicide en oncologie, la stimulation de la prolifération des vaisseaux sanguins dans le traitement des maladies cardiovasculaires, ainsi que la restauration de la fonction d'un gène.

Pour effectuer une thérapie génique, la première étape consiste à introduire l'acide nucléique à l'intérieur de la cellule.

IV.2.1. L'introduire l'acide nucléique à l'intérieur de la cellule

Avant de procéder à l'introduction de l'acide nucléique, on doit en premier lieu fixer le choix de la cellule, par la suite choisir le mode d'introduction de l'acide nucléique.

a) Le choix de la cellule

Chez les eucaryotes, on peut distinguer deux principaux types de cellules : cellules somatiques et cellules germinales. Les cellules somatiques sont des cellules non reproductives, à l'opposé des cellules germinales qui sont indispensables à la reproduction sexuée. En thérapie génique, les deux types de cellule peuvent être utilisés. Cependant, dans le cas où la correction germinale est réalisée sur des germinales, le caractère génétique sera transmis au descendant et va rentrer dans la constitution de l'ensemble des cellules de l'organisme appartenant aux descendants. Ce cas de figure de transmission permanent de la correction est très enviable chez les plantes. Cependant, chez l'homme la thérapie génique germinale est très possible dans l'éradication des pathologies génétiquement transmissibles. Ce là dit, les scientifiques sont très prudents en ce qui concerne l'utilisation de la thérapie génique germinale, par crainte de possibles conséquences imprévues et préjudiciables pour la transmission des gènes corrigés. De ce fait, uniquement la thérapie génique somatique est autorisée. Les conséquences de cette approche sont restreintes à l'individu traité, ce qui renforce la capacité de les maîtriser. Cependant, leur durée de vie est brève, du coup l'administration répétées du produit de la thérapie est indispensable pour maintenir la vie du patient. Pour éviter de devoir administrer ces souches somatiques de manière répétée, on privilégie l'utilisation de cellules souches somatiques multipotentes lors du choix des cellules.

Les souches multipotentes, présentes à faible nombre et elles persistent chez l'adulte. Ces cellules émergent après la période de gastrulation, qui correspond à la formation des feuilletts embryonnaires. Ces cellules ne peuvent pas évoluer en cellules germinales, mais il est faisable de les diriger vers diverses lignées cellulaires.

Cette approche est couramment employée lors de recherches visant à élaborer des thérapies pour les maladies du sang et du système immunitaire d'origine génétique : syndrome de Wiskott- Aldrich et de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X. En attendant d'avoir une maîtrise complète (Mode d'administration), La thérapie génique réalisée au moyen de cellules souches somatiques multipotentes fœtales, *in utero* chez les souris, présente des résultats encourageants, notamment en ce qui concerne la réversion du phénotype de la fibrose kystique ou mucoviscidose chez la souris. Cette approche comporte deux principaux avantages : tout d'abord, le nombre de cellules souches somatiques disponibles chez le fœtus est beaucoup plus élevé que chez l'adulte, et ensuite, le système immunitaire du fœtus étant encore immature, il présente une moindre réactivité aux

séquences nucléotidiques étrangères, réduisant ainsi le menace de réaction immunitaire liée à l'administration du traitement.

b) Le mode d'introduction de l'acide nucléique

La pénétration de l'acide nucléique dans la cellule à l'intérieur de la membrane cellulaire ; peut suivre deux modes différents, soit suivant des techniques physico chimiques ou bien par vectorisation suivit d'un transfert.

La technique physico chimique se base sur une modification de la perméabilité de la cellule suivit d'un transfert direct de l'acide nucléique. L'une des techniques couramment employées est l'électroporation, qui implique l'application d'une brève décharge électrique à une suspension cellulaire. Cette impulsion crée une différence de potentiel à travers la membrane cellulaire, provoquant l'ouverture de pores membranaires et ultérieurement une modification de la perméabilité. Une autre méthode largement utilisée consiste à former des complexes entre les acides nucléiques et des molécules chimiques à charge positive, comme le phosphate de calcium, dans le but de neutraliser les charges négatives. Une autre technique, appelée la microinjection, implique l'injection directe de matériel génétique dans le cytoplasme ou le pronoyau d'une cellule récemment fécondée. Elle est couramment utilisée pour produire des animaux transgéniques, où les acides nucléiques sont injectés dans des pronoyaux fécondés qui sont ensuite implantés dans des femelles adoptives pseudo-gestantes.

Les techniques précédentes sont simples et peu coûteuses. Néanmoins, ces méthodes présentent quelques inconvénients significatifs, notamment une faible efficacité de transfert et des défis liés à leur application in vivo. C'est pourquoi les scientifiques ont développé de nouvelles approches visant à améliorer le transfert du matériel génétique, notamment par le biais de la "vectorisation" des acides nucléiques

La technique de la vectorisation se base sur l'utilisation des vecteurs, qui sont des acides nucléiques capables de véhiculer un matériel génétique. Comparé aux autres méthodes, l'utilisation de vecteurs présente l'avantage d'assurer un transfert simplifié du matériel génétique à travers les membranes cellulaires, tout en offrant une protection contre les composants cellulaires qui pourraient dégrader l'acide nucléique, tels que les nucléases et les lysosomes. De plus, certains vecteurs peuvent grandement faciliter l'insertion des acides nucléiques dans le génome cellulaire.

On distingue deux types de vecteurs à savoir vecteurs viraux et non viraux ou synthétique. Les vecteurs viraux sont des virus modifiés génétiquement dans le but de permettre le transférer et l'expression de leurs propres gènes ou des gènes transféré. Les vecteurs viraux sont préconisés lorsque l'on souhaite transférer du matériel génétique dans des cellules, en particulier dans le but d'obtenir une expression significative du transgène et/ou une intégration stable de ce dernier dans le

génomique cellulaire. En revanche, les vecteurs non viraux, dépourvus de tout pouvoir infectieux, nécessitent une approche plus complexe pour leur introduction dans les cellules cibles en thérapie génique, souvent en recourant à des techniques favorisant leur passage à travers les membranes cellulaires.

Le choix du vecteur doit répondre à plusieurs conditions à savoir : la sécurité, une des conditions qui peut être garantie à l'aide de vecteurs non intégratifs qui évitent tout risque de mutagenèse insertionnelle ; une capacité de production à grande échelle, de façon simple et à moindre coût ; une stabilité au sein des cellules cible permettant de réduire l'induction des réponses immunitaires ; une grande capacité d'encapsulation, autorisant l'introduction de transgènes de longues séquences nucléotidiques contenant tous les éléments de régulation d'expression.

c) Les voies d'administration de l'acide nucléique

Selon les caractéristiques du produit, les types de cellules cibles, ainsi que les indications stratégiques et les objectifs thérapeutiques, l'administration des produits de thérapie génique peut se réaliser de deux manières distinctes : *in vivo* ou *ex vivo*. La thérapie génique *ex vivo* offre la possibilité de cibler une population cellulaire spécifique tout en permettant d'analyser les mécanismes d'expression du transgène (la séquence nucléotidique étrangère responsable des effets de la thérapie génique) et la persistance du vecteur au sein des cellules. Cette analyse inclut la détermination de l'intégration éventuelle dans le génome, la localisation des sites d'intégration, ainsi que les séquences des fragments intégrés.

Avec la thérapie génique *ex vivo* le gène est porté sur un vecteur viral, par la suite il est intégré dans la cellule de moelle osseuse, après une multiplication de ces cellules, elles sont injectées dans le tissu de l'organe cible.

Cependant, il n'est pas toujours possible d'isoler les cellules à corriger, et dans de tels cas, l'administration du vecteur ne peut pas être élaborer *ex vivo*. Cela se produit notamment lorsque l'on souhaite modifier des cellules cardiaques ou des neurones. Dans de telles situations, il est envisageable d'injecter directement le vecteur contenant le transgène dans les organes cibles, ce qui est connu sous le nom d'administration *in vivo*. Des protocoles ont été mis en place, comme dans le cas de l'amaurose congénitale de Leber, où l'injection du vecteur contenant le transgène se réalise directement dans la rétine.

IV.2.2. Les différentes stratégies de la thérapie génique

Afin de s'adapter aux particularités des différentes pathologies ciblées, deux stratégies sont mises en œuvre : la modification des séquences génomiques et la modulation de l'expression du génome sans altération des séquences elles-mêmes (Tableau n° I).

IV.2.2.1. Modification des séquences génomiques « Thérapie génique additive »

La thérapie génique additive implique l'insertion d'une copie fonctionnelle d'un gène dans le génome de la cellule. Selon le transgène introduit, deux applications sont envisageables.

I. La thérapie de remplacement : Elle vise à rétablir la fonction physiologique normale d'un gène muté au sein des cellules fonctionnelles. Elle est utilisée pour traiter les maladies monogéniques à transmission récessive. Cela inclut les patients atteints du syndrome de Wiskott- Aldrich (gène WAS) et de l'anémie de Fanconi (gène FANCA), par exemple.

II. Lorsque le transgène représente une séquence qui n'est pas normalement exprimée dans la cellule cible de la thérapie génique, l'objectif est de renforcer la réponse de l'organisme contre une maladie spécifique en lui conférant une nouvelle fonction. Cette approche de thérapie génique est largement employée dans la lutte contre le cancer, comme dans le cas de la leucémie, où elle favorise la détection et l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Elle est aussi très recommandée chez les patients atteints de la pathologie neurodégénératives tels que le Parkinson.

IV.2.2.2. Modification des séquences génomiques « Thérapie génique additive »

a) La correction génique in situ de mutations ponctuelles

La correction génique in situ permet une correction ciblée des mutations pathogènes au sein des séquences alléliques touchées. Pour y parvenir, un clivage est créé dans le génome à proximité de la mutation ciblée à l'aide d'endonucléases. Ensuite, cette correction est réalisée grâce à une recombinaison homologe avec une matrice contenant la séquence de remplacement de la région mutée, encadrée par deux bras d'homologie complémentaires aux séquences environnantes.

Cette technique est employée dans le développement thérapeutiques de : l'épidermolyse bulleuse et la β thalassémie à l'aide de TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nuclease). Une autre stratégie de correction génique ciblée de l'hyperoxalurie primitive de type 1 employant le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - associated system).

b) Interruption de la séquence d'un gène par introduction de mutation « Knocking out method »

La méthode la plus effective pour inhiber l'expression d'un gène, qui peut contribuer au développement d'une maladie, est l'introduction ciblée de mutations dans sa séquence à l'aide d'endonucléases spécifiques. Après un clivage double-brin d'une séquence d'ADN par les MNs (Meganuclease), ZFNs (Zinc Finger Nuclease), TALENs (Transcription Activator-Like Effector

Nuclease) et CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - associated system), deux mécanismes de réparation sont activés : le processus de recombinaison homologue (Homology Directed Recombination (HDR)) et la voie de jonction non homologue des extrémités (Non Homologous End Joining (NHEJ)). Le mécanisme de recombinaison dirigée par l'homologie (HDR) permet de réparer la cassure tout en maintenant la séquence génomique d'origine, tandis que le processus de jonction des extrémités non homologues (NHEJ) conduit généralement à la création d'insertions ou de délétions dans la séquence réparée. Cela entraîne un décalage du cadre de lecture et un arrêt de la synthèse protéique. La méthode de knock-out est particulièrement appropriée pour le traitement des infections, car elle repose sur l'inactivation de l'expression d'un gène essentiel à la pénétration et/ou à la dissémination des agents infectieux dans leurs cellules cibles. Chez l'homme, cette approche est employée pour traiter les infections causées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

IV.2.2.3. Modulation de l'expression génomique

a) Réduction de l'expression génique par interférence à ARN (RNAi) « Knocking down method »

Le principe de l'interférence à ARN (RNA interference ou « RNAi ») repose sur l'inhibition spécifique de l'expression génique grâce à la reconnaissance de séquences d'ARN messagers (ARNm) endogènes par des fragments d'ARN double-brin. Dans les cellules animales, small interfering RNAs, ou siARNs (21-22 nucléotides), proviennent de la maturation de séquences d'ARN plus longues qui présentent des structures en épingles à cheveux. Ces ARN plus longs sont appelés micro-ARNs ou « miARNs ».

Le knocking down est particulièrement utilisé pour remédier aux maladies définies par une surexpression génique, tels que les cancers : une réduction de la prolifération du caractère invasif du cancer de la vessie a ainsi été décrit *in vitro* suite à l'utilisation des iRNAs ciblant le gène MACC1 (Metastasis Associated in Colon Cancer1). Notamment, elle est utilisée *in vitro* dans le traitement du cancer du sein, après réduction de l'expression du gène SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) par des siRNAs spécifique.

b) Saut d'exon

Comme connu que lorsqu'une anomalie génétique se traduit par l'apparition d'un codon stop au sein d'un exon, ou par le décalage du cadre de lecture d'une séquence, cela a pour conséquence la production d'une protéine tronquée, non fonctionnelle, qui est souvent dégradée, voire l'absence totale de synthèse protéique. A partir de ce point, l'objectif de la technique du saut d'exon est de provoquer l'élimination de cet exon lors du processus d'épissage de l'ARNm, afin de supprimer les codons stop et de rétablir le cadre de lecture : La protéine synthétisée est ensuite légèrement

tronquée, mais demeure fonctionnelle et est produite à des niveaux similaires aux protéines non mutées. Cette technique est employée dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une maladie musculaire dégénérative d'origine génétique caractérisée par une perte progressive de la fonction musculaire que lettique et cardiaque, et dont l'hérédité est récessive liée au chromosome X.

V. Série de TD 02

Enoncé exercice 01 :

Si nous travaillons avec un ADN linéaire tel que celui montré ci-dessous



Quelle est la taille en paires de bases des fragments d'ADN obtenus en effectuant des digestions simples par les enzymes d, e et F des doubles digestions avec diverses combinaisons entre eux ?

NB: Les chiffres correspondent au nombre de paires de bases d'ADN (Taille totale est de 1500pb).

Enoncé exercice 02:

Voici les fréquences de recombinaison de quelques gènes sur un des chromosomes de *Drosophila*

Gène	Fréquences de recombinaison
Yeux banches (w) et yeux à facettes (f)	1.5 %
Yeux banches (w) et yeux échinus (e)	4%
Yeux banches (w) et yeux rubis (r)	6 %
Yeux à facettes (f) et yeux échinus (e)	2.5 %
Yeux à facettes (f) et yeux rubis (r)	4.5%

- Déterminer la fréquence de recombinaison entre le gène (e) et (r), Avec les justifications.
- A. 3.5%
 - B. 2%
 - C. 1.5%
 - D. 0.5%

Tableau n° I : Les différentes application de la thérapie génique
(Kayser et al., 2005)

Pathologie	Définition	Application de la thérapie génie
Anémie de Fanconi	pathologie génétique à transmission hétérogène caractérisée par des malformations congénitales variables, une insuffisance médullaire d'apparition retardée et un risque élevé d'apparition de leucémie aiguë et de cancers	La thérapie de remplacement (la modification d'un seul allèle, au niveau du locus du gène déficient, permet de restaurer le phénotype physiologique)
Le syndrome de Wiskott-Aldrich	Déficit immunitaire primitif lié au chromosome X, consécutif au dysfonctionnement du gène WAS codant pour la protéine WASP, régulatrice du cytosquelette d'actine)	La thérapie de remplacement et le vecteur c'est un lentivirus. les cellules initialement corrigées correspondent aux cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes, multipotentes et spécifiques du tissu sanguin. Après introduction des CSH génétiquement modifiées dans l'organisme des patients, celles-ci sont capables de se différencier en cellules lymphoïdes (lymphocytes B et T) et myéloïdes (granulocytes, monocytes, érythrocytes, thrombocytes) porteuses de la modification.
Syndrome de l'adrénoleucodystrophie	pathologie cérébrale se traduisant par une démyélinisation progressive, causée par le dysfonctionnement du gène ABCD1 codant pour la protéine du même nom, qui correspond à un transporteur cellulaire se liant à l'ATP	La thérapie de remplacement et le virus c'est le lentivirus
La mucoviscidose	Pathologie pulmonaire caractérisée par une accumulation de mucus dans les voies respiratoires, consécutive à une mutation du gène CFTR ou Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator codant pour un transporteur cellulaire d'ions chlorures	Des essais cliniques ont répondu positivement : des vecteurs adénoviraux recombinants pourvus de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène CFTR humain ont été introduits dans l'épithélium nasal et bronchique. Et ils ont obtenus une expression épithéliale de l'ADNc CFTR, en l'absence de réponse immunitaire délétère et de dissémination ou recombinaison du vecteur adénoviral
L'amaurose congénitale de Leber	Une dystrophie héréditaire sévère de la rétine entraînant une diminution précoce et progressive de la vision, jusqu'à la cécité. Cette rétinopathie pigmentaire liée au chromosome X, caractérisée par des dommages du réseau vasculaire rétinien entraînant une perte de la vision	<ul style="list-style-type: none"> • L'injection du vecteur contenant le transgène se fait directement dans la rétine, <i>in vivo</i> • Vectorisation et transfert d'acides nucléiques

La leucémie lymphoïde chronique	Elle se caractérise par une prolifération anormale des lymphocytes B	Une réparation fonctionnelle de l'ARNm <i>via</i> la technologie de <i>trans</i> -épissage a été rapportée dans de nombreuses études <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> . Elle se base principalement sur une correction génétique de la mutation CD22ΔE12
Le cancer colorectal		<p>La thérapie de remplacement, conférant une nouvelle fonction aux cellules traitées pour favoriser la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire (Adénovirus). Ou bien l'emploi de la technologie de l'interférence à ARN est particulièrement adapté au traitement des pathologies caractérisées par une surexpression génique Correction de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription p53 (impliqué dans la régulation du cycle cellulaire) par <i>trans</i>-épissage a conduit à une réduction significative de la croissance tumorale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>, un arrêt du cycle cellulaire et une entrée des cellules en apoptose.</p>
Parkinson	Cette pathologie se caractérise par un dysfonctionnement moteur, tremblements de repos, rigidité et bradykinésie ou ralentissement psychomoteur) consécutif à la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire du cerveau, qui projettent leurs axones vers le striatum où la dopamine est libérée.	<p>La thérapie de remplacement. Par l'utilisation du vecteur lentivirus, on procède à une introduction de la biosynthèse de la dopamine.</p>

Chapitre 03 « Les usines unicellulaires et pluricellulaires »

En raison de la croissance significative du marché biopharmaceutique et de l'évolution de nombreuses maladies, la demande de production de molécules thérapeutiques plus efficaces augmente de manière constante.

Pendant de nombreuses années, les protéines à des fins thérapeutiques étaient obtenues à partir de sources naturelles comme le sang, le placenta, ou d'autres extraits de tissus humains ou animaux. Cependant, cette approche présentait des limitations, notamment des quantités limitées de production, ainsi que des risques potentiels pour la sécurité des patients en raison de la possibilité de contamination par des virus tels que le VIH, l'hépatite ou les prions.

I. Le lancement des usines unicellulaires et pluricellulaires

L'avènement des techniques de l'ADN recombinant a ouvert la voie au développement de nouveaux procédés de production de protéines, utilisant divers systèmes d'expression. L'identification et la reproduction des gènes responsables de la synthèse des principales protéines humaines à des fins thérapeutiques ont permis la production de ces protéines par des organismes étrangers, ce qui a donné naissance à des protéines dites "recombinantes" en tant qu'alternative aux protéines extraites. Actuellement, la grande majorité des protéines thérapeutiques sont produites de cette manière. En raison de leur large éventail de fonctions biologiques, les protéines sont couramment utilisées dans de multiples applications médicales.

Les anticorps monoclonaux représentent la première catégorie de protéines thérapeutiques à avoir été identifiées. Ils se sont rapidement imposés comme les produits pharmaceutiques les plus largement développés pour de nouvelles applications thérapeutiques, en particulier dans le traitement du cancer. Bien que leur production à l'échelle industrielle soit en constante expansion, elle demeure encore relativement coûteuse.

II. Les protéines recombinantes

Les protéines recombinantes sont synthétisées en insérant un transgène dans un organisme étranger grâce à des techniques de génie génétique. Ce processus biotechnologique peut être divisé en cinq grandes phases:

Dans la première phase, on élabore un vecteur d'expression, qui est généralement un plasmide ou un virus, servant de véhicule pour le gène responsable de la protéine d'intérêt..

La deuxième phase implique la modification d'une cellule hôte ou d'un organisme complexe en utilisant le vecteur d'expression.

La troisième phase consiste à créer ce nouveau système d'expression, qui met en œuvre les instructions données par le transgène, en produisant la protéine souhaitée. Il existe actuellement une

variété de systèmes d'expression disponibles, chacun présentant ses propres avantages et inconvénients. La plupart des protéines recombinantes commercialisées aujourd'hui sont principalement produites à partir de bactéries, de levures, de cellules de mammifères et d'œufs embryonnés.

La quatrième phase comprend la séparation de la protéine du milieu de culture si elle est sécrétée, ou son extraction du milieu intracellulaire le cas échéant, suivie de sa purification.

Enfin, la cinquième phase consiste à caractériser la molécule et à vérifier son niveau de pureté.

Bien que les protéines thérapeutiques aient connu des avancées significatives, les scientifiques devront relever un ensemble de défis, notamment :

- L'optimisation du système d'expression des molécules par une amélioration de la productivité des clones et des techniques et rendements de production en masse, une mise au point de milieux de culture exempts de sérum bovin (éliminant ainsi les risques de contamination, notamment par les prions).
- Atteindre l'excellence opérationnelle par l'amélioration des performances et rendements en extraction/purification des molécules, développement des process analytique technologies pour limiter les coûts et délais des contrôles en cours de process, développement des technologies de production à usage unique pour limiter les coûts et délais inféodés aux procédés connexes à la production (nettoyage et stérilisation notamment) et aux actions d'assurance-qualité associées (qualification des équipements, validation des procédés connexes...), optimisation des flux et des cycles de production... ;
- Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des biomolécules et de l'impact de leur structure tri-dimensionnelle sur leur activité, en vue d'orienter le choix du modèle d'expression en fonction de l'application thérapeutique ciblée.

III. Série de TD 03

Enoncé : En utilisant les moteurs de recherche scientifique, Rédigez une petite synthèse bibliographique (10 lignes) sur l'une protéine recombinante produite à ce jour

Liste des références bibliographiques

Bouchet Ph, Guignard J-L et Villard J. Les champignons (Mycologie Fondamentale et appliquée). Abreges, Masson, Paris, 1999.

Brock T, Madigan M, Martinko J.M. Brock Biologie des Micro-organismes, 11ième Edition, PEARSON, Paris, 2007 pp 720-790.

Hart Tony et Shears Paul. Atlas de Microbiologie, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris.1997.

Kayser FH, Biez K A, Eckert J, Znkerngel RM. Medical Microbiology. Thieme, New York, 2005.

Lydyard P.M, Whelan A and Fanger MW. L'essentiel en immunologie. BERTI Editions, Paris, 2002,

Nicklin J, Graeme-Cook K, Paget T et Killington R. L'essentiel en Microbiologie. BERTI Editions, Paris, 2000.

Prescott, Harley and Klein's, Microbiology, Seventh Edition, 2008. pp 718-780.

Schaechter M, Medoff G, Eisenstien BL. Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck, Paris, 1999.

Les références électroniques

Site 01 : <https://www.exobiologie.fr/blog/2006/08/23/la-cellule-minimale-point-de-vue-du-biologiste/>

Site 02 : <https://www.nagwa.com/fr/explainers/519158434803/>

Site 03 : <https://slideplayer.fr/slide/1642832/>

Site 04 : <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.45>

Site 05 : <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/genetique-medicale-structure-et-fonction-du-genome-humain>

Site 06 : <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/genetique-medicale-structure-et-fonction-du-genome-humain>

