

MANIPULATIONS GENETIQUES, 45 ANS APRES :

De la manipulation du gène à celle du génome
et au-delà...

Philippe Jeanteur
Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)
CNRS-Université de Montpellier
Académie Nationale de Médecine

philippe.jeanteur@yahoo.fr

Manipulation génétique,
Recombinaison in vitro,
Génie génétique,
Clonage

sont des termes pratiquement synonymes
et tous employés

QUELQUES DATES

- Première « recombinaison génétique in vitro » : 1972
- Première production industrielle d'une protéine humaine dans une bactérie : l'insuline humaine (Eli Lilly) : 1982
- Premières souris transgéniques : 1982
- Premiers succès de thérapie génique : décennie 2010

UNE EXTRAORDINAIRE CONJONCTION TECHNOLOGIQUE

- Génie génétique
- Transgénèse
- Séquençage
- Bio-informatique

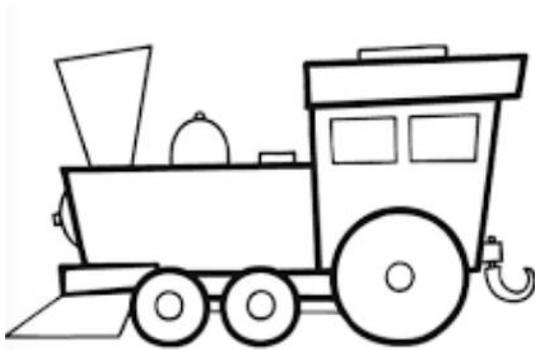
1^{ère} Partie : La procédure de recombinaison génétique in vitro (1972)

- Recombinaison = création d'une nouvelle combinaison
- Génétique : au niveau du gène donc de l'ADN
- In vitro : au laboratoire « dans le tube à essai »
- Dans le but de créer une nouvelle entité biologique

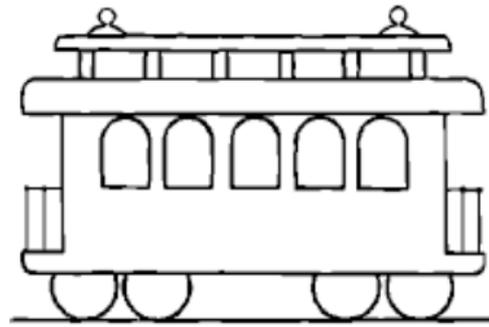
LE PROTOCOLE DE BASE

- Il s'agit d'insérer un morceau d'ADN « étranger » dans une cellule de l'organisme à modifier
- Il faut donc qu'il puisse d'abord y pénétrer puis s'y reproduire
- D'où la nécessité d'un vecteur
- Et d'un attelage entre les deux

Vecteur



ADN étranger

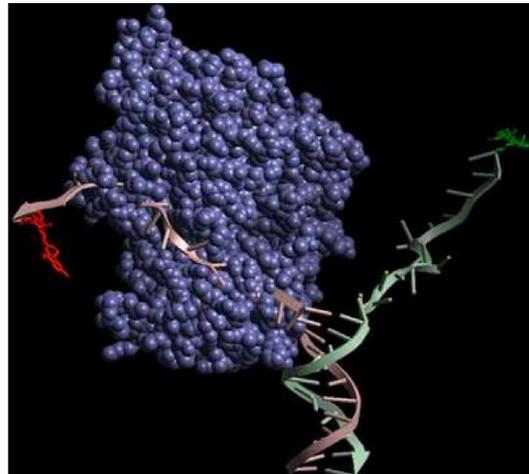
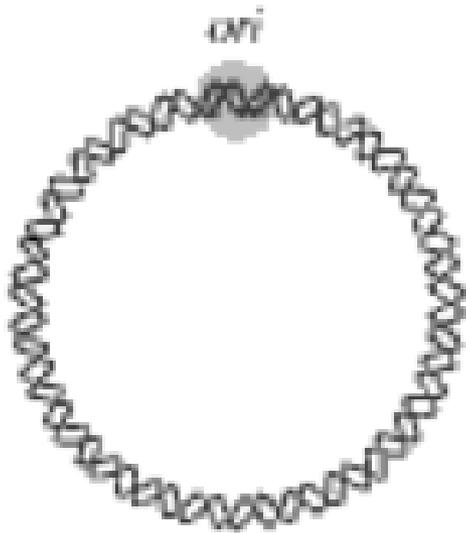


UN VIRUS EST UN VECTEUR IDEAL

- Il est capable de pénétrer dans la cellule-cible
- Et de s'y multiplier
- En restant en-dehors des chromosomes
- De nombreux virus sont utilisés comme vecteurs, même le virus HIV...

UN VECTEUR PEUT SE REPLIQUER DE FACON AUTONOME

Il possède une région de son ADN capable d'initier la réplication.
On dit qu'il a une origine de réplication



LES PARTENAIRES D'UNE RECOMBINAISON GENETIQUE IN VITRO

- Le vecteur

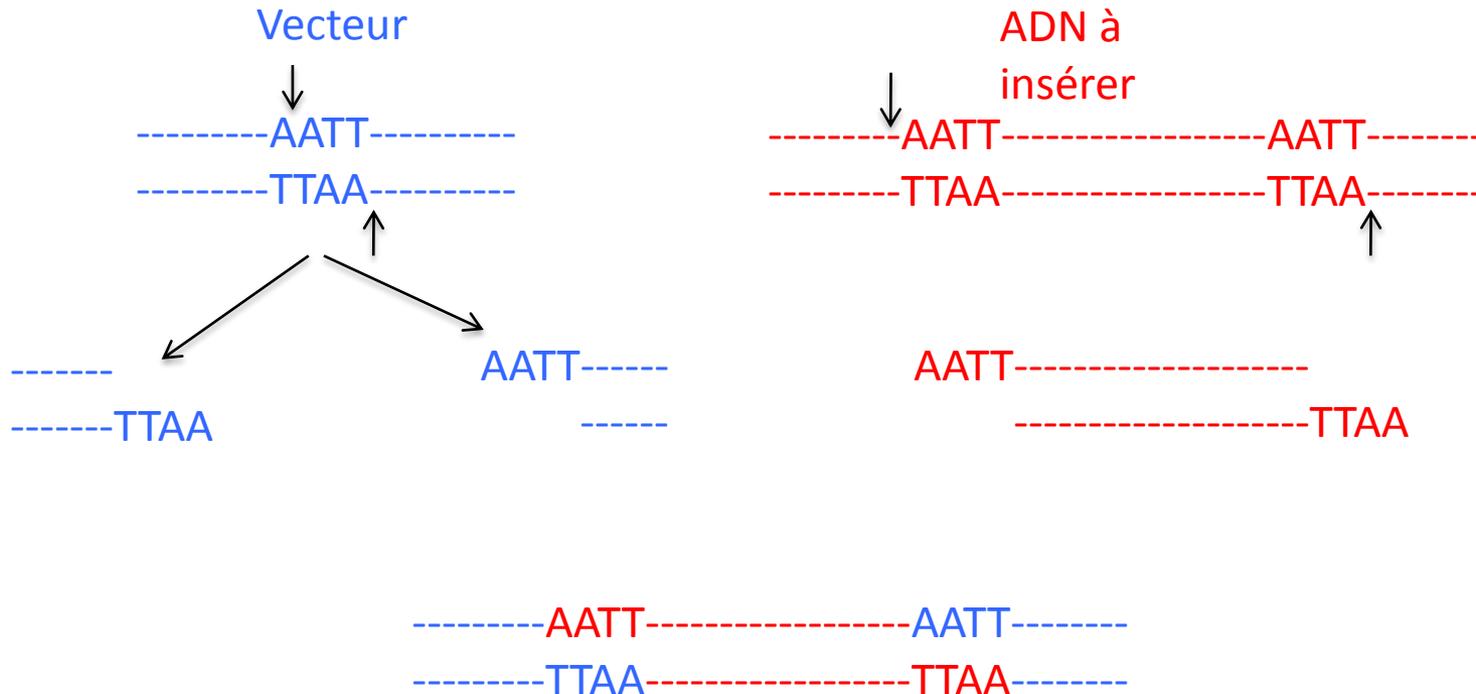
- Molécule d'ADN circulaire, capable de se répliquer
- Ouverte en un seul endroit
- Par une enzyme très spécifique (enzyme de restriction)

- L'ADN à insérer

- Provient en général d'un ADN de très grande taille
- Découpé par la même enzyme
- En un grand nombre de fragments
- Tous susceptibles d'être insérés

LE PROCESSUS DE RECOMBINAISON

- Les coupures engendrées par les enzymes utilisées engendrent des extrémités identiques chez le vecteur et l'ADN étranger puisque générées par la même enzyme
- donc susceptibles de s'apparier. On dit qu'elles sont cohésives.



MULTIPLICATION DANS UN ORGANISME PRODUCTEUR

- De très nombreuses méthodes ont été développées pour introduire les molécules d'ADN recombinées
- Dans un organisme intermédiaire où elles pourront se multiplier : bactéries, levures, cellules animales ou humaines
- La population de fragments à insérer étant très hétérogène
- Il en résultera une population de cellules elles-mêmes très hétérogène
- Mais chacune de ces cellules génétiquement modifiées n'hébergera **qu'un seul fragment d'ADN étranger**

POURQUOI PARLE-T-ON DE CLONAGE ?

- Chacune de ces colonies est un clone car issue du même fragment d'ADN recombiné
- Mais chacune porte un fragment différent
- D'où la nécessité de sélectionner le clone recherché
- L'étape la plus longue et difficile
- A ce stade, on dit qu'on a cloné un gène, c'est-à-dire qu'on l'a obtenu à l'état pur



Cloner = Purifier

PREMIERES CRAINTES

- 1975 : Conférence d'Asilomar
 - Les Etats-Unis interdisent l'utilisation de crédits d'état à des fins de manipulations génétiques (mais pas pour les fonds privés...)
 - De nombreux comités de contrôle a priori sont constitués un peu partout dans le monde, en France y compris
 - Critères d'acceptabilité extrêmement stricts
- A ce jour, aucun effet délétère sur la santé lié à un organisme cloné n'a été enregistré

2^{ème} Partie : les différents usages du gène cloné

- Recherche, sans quitter le laboratoire
- Production industrielle d'un produit biologique
- Création d'un organisme génétiquement modifié (OGM), animaux et plantes transgéniques
- Usage thérapeutique : thérapie génique

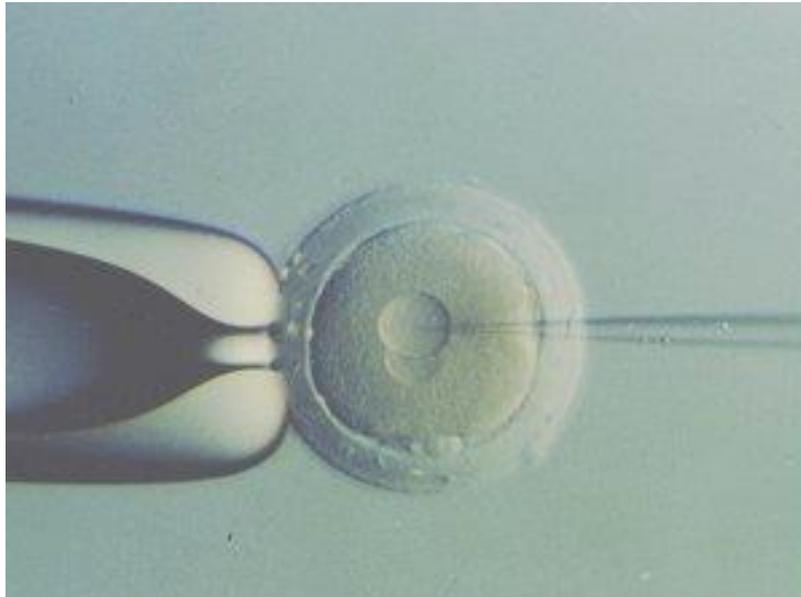
PRODUCTION INDUSTRIELLE D'UN PRODUIT BIOLOGIQUE

- 1982 : 1^{ère} Production industrielle d'une protéine humaine dans une bactérie :
l'insuline humaine (Eli Lilly)
- De très nombreuses autres protéines ont suivi : Hormone de croissance humaine (Eli Lilly),
facteurs de croissance, facteurs de coagulation, facteurs anti-thrombo-emboliques, etc...
- Anticorps monoclonaux (Mab) : 75 déjà approuvés par la FDA. Très utilisés en cancérologie
 - Ximab : chimérique : Rituximab (Mabthera)
 - Zumab : humanisé : Trastuzumab (Herceptin), pembrolizumab (Keytruda)
 - Umab : humain : Adalimumab (Humira)

QU'EST-CE QU'UN ANIMAL TRANSGENIQUE ?

- C'est un animal dont le génome a été modifié artificiellement : c'est un OGM
 - Soit par l'introduction de gènes étrangers/gènes médicaments par la technique de micro-injection
 - Soit par la modification /réparation de séquences déjà présentes par la technique de recombinaison homologue
- Ces modifications doivent être présentes dans la lignée germinale afin d'être héréditaires

INJECTION DU GENE DANS L'OVULE FECONDE

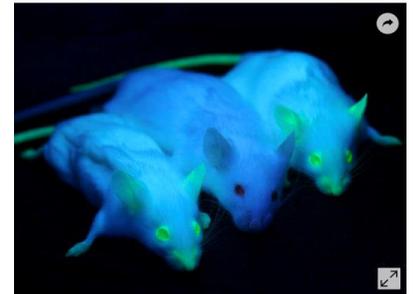


ANIMAUX TRANSGENIQUES (I)

1984 / 1^{ère} Souris transgénique exprimant
l'hormone de croissance humaine



Souris exprimant une protéine fluorescente



Poissons exprimant différentes protéines fluorescentes



ANIMAUX TRANSGENIQUES (II)

- Modèles animaux de maladies humaines, rats, souris
- Amélioration d'animaux d'élevage : vaches (amélioration du lait, de la production de viande)
- Production dans le lait de protéines à usage thérapeutique
- Xénogreffes : porcs modifiés pour les rendre tolérables par le système immunitaire humain

PLANTES TRANSGENIQUES

- Tolérance aux herbicides : Maïs transgénique de Monsanto résistant au glyphosate
- Résistance aux ravageurs
- Production de produits médicaux
- Problème de dissémination dans la nature

THERAPIE GENIQUE

On oppose :

- La thérapie génique somatique qui soigne le corps de l'individu malade, voire seulement l'organe malade mais pas les cellules sexuelles et donc pas la descendance
- La thérapie génique germinale qui viserait à éradiquer la maladie jusque dans la descendance. La transgénèse relève de cette catégorie

THERAPIE GENIQUE SOMATIQUE

- Elle repose sur les technologies du génie génétique développées à partir des années 70
- Elle consiste à introduire dans les cellules du malade un gène sain (gène médicament) là où la maladie était causée par un gène muté ou absent.
- Donc dans des maladies touchant le génome : cancer et maladies génétiques héréditaires

MALADIES GENETIQUES ET CANCER

- Ce sont toutes les deux des maladies « génétiques » puisqu'elles touchent le génome, mais elles sont fondamentalement différentes
- Les unes sont héréditaires, l'autre pas

DANS LES MALADIES GENETIQUES

- Les anomalies du génome qui causent la maladie sont héréditaires.
- Elles existaient déjà chez les parents et elles sont présentes dans toutes les cellules du corps, y compris les cellules sexuelles.
- Tous les organes ne sont pas affectés pour autant
- La thérapie génique somatique pourrait donc être efficace pour guérir le malade mais pas sa descendance

DANS LE CANCER

- La maladie n'est pas héréditaire. Elle résulte de modifications acquises du vivant du patient et seulement dans l'organe malade.
- Les gènes médicaments utilisés sont très variés :
 - Gène dont le produit sera toxique pour les cellules cancéreuses
 - Gène capable d'améliorer la reconnaissance et la destruction de la cellule cancéreuse par le système immunitaire

UN POINT DE SITUATION

- Les premiers et seuls succès sont en matière de thérapie somatique des maladies héréditaires dans les années 2010 et ont été réalisés en France
- Rien encore en matière de thérapie germinale mais beaucoup de progrès à venir...

THERAPIE GENIQUE GERMINALE

- Puisqu'elle vise à traiter la descendance,
 - Elle doit s'attaquer à la lignée germinale
 - Et ne pourrait concerner que les maladies héréditaires
 - Mais est-ce bien la seule solution ?
- Mais on pourrait l'appliquer aussi à seule fin de modifier le génome sans objectif thérapeutique et ça devient alors très problématique.

Créer une lignée au patrimoine génétique modifié de façon héréditaire est monnaie courante chez l'animal

Il en existe des milliers de par le monde dans des espèces très
variées et dans les buts les plus divers

Ce sont des animaux transgéniques

Mais la technologie de construction d'un animal transgénique est très longue et compliquée

Au point que l'application à l'homme était jusqu'à présent complètement inimaginable

Aussi un consensus pour la bannir s'est-il imposé très facilement

CONTEXTE JURIDIQUE ACTUEL

- Convention d'Oviedo (1997) : interdiction absolue de toute modification héréditaire du génome humain
- Ratifiée par la plupart des pays européens mais pas par le Royaume-Uni, ni les Etats-Unis, ni la Chine

3^{ème} Partie : La révolution CRISPr-Cas9

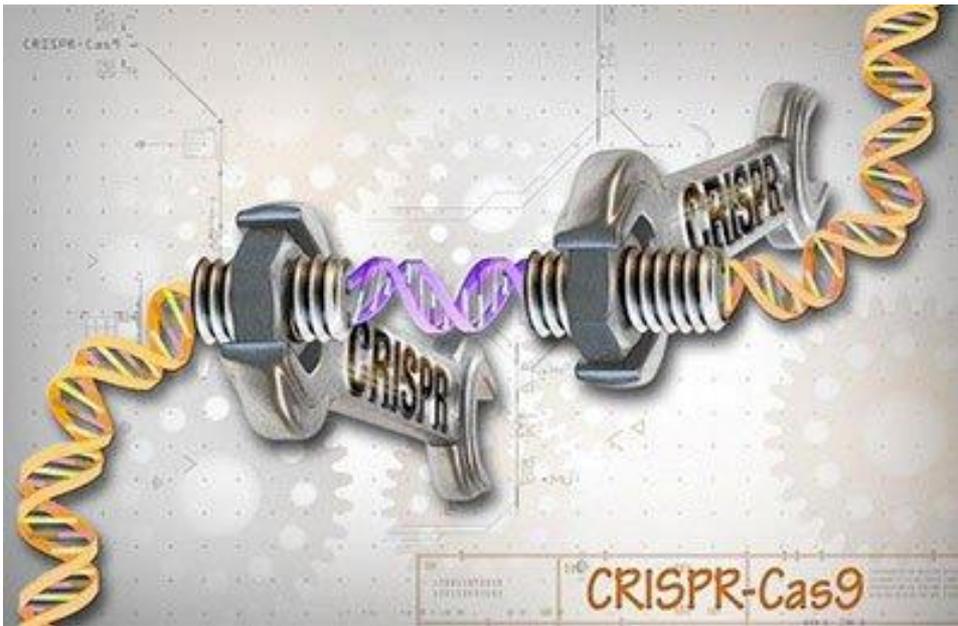
Retour sur la thérapie génique germinale

La situation a radicalement changé depuis trois ans grâce à la découverte d'un nouvel outil moléculaire qui bouleverse complètement les données pratiques du problème

CRISPR-Cas9

- C'est un système enzymatique découvert chez une bactérie et qui lui permet de lutter contre l'invasion par des ADNs étrangers
- Découvert conjointement par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna en 2012
- Naturellement destiné à couper l'ADN en des sites très précis, il est très facile à adapter pour couper là où on le souhaite
- D'où sa très grande utilité pour toutes les opérations de génie génétique

CRISPR-Cas9



LA THERAPIE GERMINALE EST DONC
MAINTENANT TECHNIQUEMENT ENVISAGEABLE

MAIS POUR QUELS BENEFICES ?

ET AVEC QUELS RISQUES ?

QUELQUES NOTIONS DE BASE (1)

- Toutes les cellules somatiques de notre organisme sont **diploïdes**, c'est-à-dire qu'elles possèdent deux lots de chromosomes, l'un venant du père, l'autre de la mère...
- ... sauf les cellules germinales ou sexuelles (ovules ou spermatozoïdes) qui sont **haploïdes** (un seul lot de chromosomes).
- La transmission aux enfants des caractères parentaux obéit à la première loi de Mendel

QUELQUES NOTIONS DE BASE (2)

- Chaque gène ou caractère, normal ou responsable d'une maladie, existe donc en deux exemplaires
- S'ils sont identiques pour le gène considéré, on parle d'une situation **homozygote**, **hétérozygote** s'ils sont différents
- L'un va donc forcément l'emporter sur l'autre : il sera **dominant** face à l'autre qui sera **récessif**
- Un individu hétérozygote sera
 - **malade si la maladie est dominante** (très rare)
 - **porteur sain si la maladie est récessive** (le plus fréquent)
- D'où la distinction entre :
 - **Génotype**, ce que l'on peut lire sur la séquence des gènes
 - **Phénotype**, ce qui est apparent chez l'individu (maladie par exemple)

LES DIFFERENTS CAS POSSIBLES

- Maladie récessive (cas le plus fréquent)
 - 1 parent homozygote sain + 1 parent hétérozygote (porteur sain) : 50% enfants sains + 50% porteurs, aucun malade
 - 2 parents porteurs sains : 25% malades, 50% porteurs sains, 25% sains
 - 2 parents homozygotes malades : 100% malades
- Maladie dominante (très rare)
 - 1 parent sain + 1 parent hétérozygote (malade) : 50% sains, 50% malades
 - 2 parents hétérozygotes (malades) : 25% sains, 75% malades
 - 1 parent sain + 1 parent homozygote : 100% malades

SEULES DEUX SITUATIONS SERAIENT JUSTICIABLES DE LA THERAPIE GERMINALE

Celles qui ne peuvent en aucun cas produire de descendant sain ou porteur sain, c'est-à-dire :

- Une affection récessive pour laquelle les deux parents seraient homozygotes malades (mais auraient-ils alors la capacité d'être parents ?)
- Une maladie dominante pour laquelle l'un des parents serait homozygote malade
- Ce sont des cas très rares

Pour tous les autres cas, la solution pourrait être le Diagnostic Pré-Implantatoire (DPI)

EN QUOI CONSISTE LE DPI ?

- Tout commence par une FIV pour produire le plus grand nombre possible (quelques uns) d'embryons
- Qu'on laisse se développer au laboratoire jusqu'au stade 4-8 cellules qui sont toutes identiques et toutes totipotentes (capables de donner une individu entier normal)
- On prélève une de ces cellules sur chaque embryon sur lesquelles on recherche la mutation
- On réimplante le ou les embryons sains, s'il y en a

LE CADRE REGLEMENTAIRE DU DPI

- Loi N° 94-564 du 29/07/94
 - Forte probabilité d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable
 - Anomalies préalablement identifiées chez l'un des parents
 - Consentement
 - Limité à l'affection considérée
 - Autorisation délivrée par l'agence de la biomédecine
- Décret du 24/03/98 : 4 centres agréés : Paris, Montpellier, Strasbourg et Nantes

EST-CE POUR AUTANT LA PANACEE ?

- Chacune de ces étapes connaît une fraction significative d'échecs
 - Le nombre d'ovocytes obtenus au départ est limité (5 à 10)
 - Tous ne vont pas commencer leur développement dans le tube
 - La fraction d'embryons sains est de 25 à 50 %
 - Tous les embryons sains implantés ne vont pas se développer
- Le succès final (un bébé sain) est faible (< à 20%) et la demande de thérapie germinale sera probablement significative

LE POINT SUR CRISPR-Cas9

- Août 2017 : une équipe sino-américano-coréenne a obtenu des embryons humains débarrassés d'une maladie cardiaque héréditaire
- Mais qui n'ont pas été réimplantés en raison de l'interdiction juridique
- Une autre application aussi intéressante que potentiellement dangereuse : le forçage génétique
- Restent les dérives ou fantasmes possibles si la technique venait à se libéraliser (transhumanisme, immortalité...)

4^{ème} Partie : La conjonction clonage – Séquençage

- La révolution des méga-données (big data)
- Qui maintenant s'affranchissent du clonage
- Enormes besoins de bio-informatique

LES GRANDES ETAPES DU SEQUENCAGE

- 1977: premières techniques de séquençage (Nobel en 1980)
- Années 80 : Séquençage de petits gènes (insuline, 720 nucléotides)
- 1990 – 2010 : Séquençage de nombreuses espèces
 - génome humain : 3 milliards de nucléotides : 2004 (Coût >1 milliard de dollars)
 - Bien d'autres espèces animales ou végétales
- Années 2010 : séquences individuelles (sans passer par le clonage)
 - 2008 : projet 1000 séquences humaines individuelles (Coût actuel 1000 dollars)
 - 2012 : projet 100,000 séquences humaines individuelles
 - Microbiomes
- Diminution du coût d'un facteur 1 million !!!

MERCI DE VOTRE ATTENTION

Ce diaporama sera disponible sur le site UTT ou en
me le demandant par mail

philippe.jeanteur@yahoo.fr