

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire/ Biologie moléculaire des procaryotes

Thème

L'apport de la thérapie génique dans le traitement de β -thalassémie

Présenté par :

- ✍ Abadlia Kamila
- ✍ Ammi Sabah
- ✍ Hachachnia Nazih

Devant le jury composé de :

- Président : M^{elle} : Boumaza Aouatef (M.A.B)
Examineur : M^{eme} : Ayed Hayatte (M.A.B)
Encadreur : M^{elle} : Zidi Sourour (M.A.B)

Juin 2011

☞ REMERCIEMENTS ☞

Nous tenons à remercier demoiselle Zidi Sourour pour son encadrement et son aide durant l'élaboration de ce rapport.

Nous remercions Mr Bournene Ahmed pour ses conseils et son aide tout au long du projet, sans oublier Dr Blanchette Saliha pour toute son explication.

Enfin, nous aimerions remercier les membres du jury pour leur présence lors de notre présentation.

Produced with Scantopdf

Table des matières

Introduction	
Historique	
Chapitre I : Le point sur la thérapie génique	
I-1-Définition de la thérapie génique	01
I-2-Le principe de la thérapie génique.....	01
I-3 -Les différentes catégories de la thérapie génique	03
I-3-1-Thérapie génique germinale.....	03
I-3-2-Thérapie génique somatique.....	03
I-4-Les outils de thérapie génique	04
I-4-1-Localisation de gène thérapeutique	04
I-4-2-Mode d'administration	06
I-4-2-1-EX VIVO	06
I-4-2-2-IN VIVO	06
I-4-2-3-IN SITU.....	06
I-4-3-Les vecteurs.....	08
I-4-3-1-Les vecteurs viraux.....	08
I-4-3-1-1 - construction d'un vecteur viral	08
I-4-3-1-2-Les vecteurs rétrovirus	12
I-4-3-1-3-Les vecteurs Adénovirus.....	15
I-4-3-1-4-vecteurs Adéno-associés (AAV).....	16
I-4-3-1-5-Autre vecteurs viraux.....	18
I-4-3-2-Les vecteurs non viraux	20
I-4-3-2-1-Liposomes.....	20
I-4-4-Les méthodes physiques.....	21

I-4-4-1- L'injection de l'ADN plasmidique	21
I-4-4-2-L'électroporation.....	21
I-5-Traitement par inhibition des gènes.....	23
I-5-1-La thérapie Anti-sens.....	23
I-5-2-Thérapie par Ribozyme	24
I-6-Les maladies candidats au traitement par thérapie génique.....	25
Chapitre II : Les syndromes thalassémique :	
II-1-Généralités sur l'hémoglobine humaine	26
II-1-1-L'hémoglobine normale.....	27
II-1-2-L'hémoglobine anormale.....	28
II-2- Les thalassémies.....	28
II-2-1- classification génétique.....	28
II-2-1-1- α thalassémie.....	29
II-2-1-2- β thalassémie.....	30
II-2-1-2-1- Les différentes formes de β thalassémies	31
II-2-1-2-2- La transmission de la β thalassémie.....	32
II-2-1-3-Les symptômes	33
II-2-1-4-Le diagnostic.....	34
II-2-1-5- Le traitement.....	38
II-2-1-5-1- La transfusion sanguine.....	38
II-2-1-5-2-Splénectomie	38
II-2-1-5-3-Traitement de la surcharge en fer	38
II-2-1-5-4-La greffe de moelle osseuse	40

II-2-1-5-5-Autre traitement chez l'adulte.....	40
--	----

Chapitre III: l'apport de la thérapie génique dans le traitement de β thalassémie

III-1-Le Protocole expérimental de la thérapie génique traitant beta thalassémie....	41
--	----

III-2-Résultats.....	42
----------------------	----

Conclusion et perspective

Annexe

Résumé

Produced with ScanTOPDF

Liste des figures

Numéro des figures	Le titre	Numéro de la page
01	l'introduction du matériel génétique dans la cellule cible	02
02	les étapes de la thérapie génique	02
03	Localisation de gène thérapeutique.	05
04	Les modes d'administration du gène thérapeutique	07
05	Virus	08
06	la liaison de gène thérapeutique avec la cassette d'expression	11
07	conservation des plasmides.	11
08	les vecteurs viraux contenant le gène thérapeutique.	11
09	Un rétrovirus. Virus à ARN avec enveloppe lipidique.	14
10	Construction d'un rétrovirus sauvage et d'un rétrovirus recombinant	14
11	Un adénovirus. Virus à ADN sans enveloppe	16
12	Construction d'un Adénovirus recombinant	16
13	vecteur adéno-associée (AAV)	17
14	type de virus utilisé : Lentivirus.	18
15	type de virus utilisé : Herpès simplex	19
16	Transfert de l'ADN par les liposomes	20
17	Injection d'ADN plasmidique	22
18	l'électroporation	22
19	Stratégie anti-sens de thérapie génique	23
20	thérapie par ribozyme	24

21	les différentes maladies pour lesquelles on a utilisé la TG	25
22	La structure de l'hémoglobine	26
23	évolution de la synthèse de chaîne d'hémoglobine en fonction de l'âge	27
24	l'organisation de structure de chromosome 16.	29
25	l'organisation de structure de chromosome 11	30
26	Illustration de la transmission autosomique récessive	33
27	effets de la thalassémie	34
28	électrophorèse de Hb à pH alcalin.	35
29	les différentes anomalies qui peuvent toucher les globules rouges	36
30	L'amniocentèse.	37
31	Relation entre transfusions et surcharge en Fer.	39

Produced with Scantopdf

Introduction :

« Si on considère le but d'un médicament comme la restitution d'une fonction particulièrement du corps, alors l'ADN doit être tenu comme le médicament absolu ».
(1)

L'absence ou la structure défectueuse d'un gène peut modifier la composition des protéines produites par la cellule, provoquant ainsi certaines maladies héréditaires (mucoviscidose, myopathie) ainsi que d'autres maladies (cancer). Ces maladies pourraient être combattues en insérant un gène fonctionnel dans la cellule malade pour compenser le gène absent ou défectueux ou pour augmenter la production de la protéine.

La thérapie génique est une approche de traitement ou de prévention des maladies qui utilise les gènes comme médicament.

Le principe de la thérapie génique repose sur la possibilité d'introduire dans le noyau d'une cellule cible une proportion d'ADN, qui contrôle la fabrication d'une protéine, afin d'induire un effet thérapeutique. A la différence d'un médicament qui agit sur l'activité des protéines, et sur les fonctions cellulaires, la thérapie génique cherche à intervenir plus en amont, à la source même des dysfonctionnements. (2)

La β thalassémie représente l'une des maladies traitées par thérapie génique ; c'est une forme d'anémie héréditaire qui touche chaque année 200,000 enfants à la naissance. Des transplantations de cellules souches ont déjà été couronnées de succès, mais le manque de donneurs compatibles est un vrai frein à son expansion. (3)

Dans notre travail, nous avons essayées de présenter un véritable espoir pour les malades qui ne peuvent pas avoir accès à une greffe de moelle osseuse : « **LE TRAITEMENT DE BETA THALASSEMIE PAR LA THERAPIE GENIQUE.** »

Nous avons abordé en premier lieu des généralités sur les techniques et les outils de la thérapie génique, ensuite nous avons expliqué qu'est-ce qu'une beta thalassémie, en fin, nous nous sommes intéressées à l'apport de la thérapie génique pour cette maladie.

Historique :

L'idée de l'ère des « gènes utilisés comme sonde », donc comme outils de précision remanier des gènes et de les réintroduire en tant que fonction dans un organisme avait déjà été postulée au début de l'ère de génie génétique dans les années 60 et 70, mais il était encore impossible à la réaliser à cette époque.

Les années 80 marquent une période où l'ensemble des gènes humains (le génome) furent explorés et répertoriés grâce à la génomique, science étudiant le gène : c'est le début de la Thérapie Génique. Le médecin Américain Martin Cline réalise la première expérience de Thérapie Génique, Aux Etats-Unis

En 1986, le gène de la myopathie de Duchenne sur le chromosome X par le généticien américain Anthony Monaco a été identifié.

En 1990, On célébra le premier succès partiel de la thérapie génique chez une fillette de 4 ans atteinte de déficit immunitaire en ADA (adénosine désaminase), par l'équipe du Professeur Michael Blaese à Bethesda aux Etats-Unis.

Fin 1999 début 2000, Les premiers essais cliniques sont réalisés à l'Hôpital Necker par l'équipe d'Alain Fischer sur des enfants atteints de déficience immunitaire sévères "enfants-bulles". Sur les 10 essais cliniques réalisés, 9 ont réussi et aujourd'hui, les enfants ont une vie normale. Cependant ces essais cliniques ne seront pas appliqués comme protocoles car il y a eu des effets secondaires importants tels que des cancers.

En 2006, après obtention de l'autorisation des autorités sanitaires françaises (AFSSAP), un essai clinique de phase I/II pour une grave maladie du sang « bata thalassémie » a été réalisée sous la direction scientifique de Pr Leboulch.

En 2008, Des chercheurs des Royaume-Unis annoncent une amélioration de la vue chez des patients atteints d'une maladie des yeux héréditaire rare, la maladie de Leber, qui ont suivi une thérapie génique.

2009, Succès en Thérapie Génique, une équipe de l'Inserm mené par Nathalie Cartier et Patrick Aubourg, réalise une thérapie génique sur deux enfants atteint d'Adrénoleucodystrophie, maladie liée au chromosome X affectant le cerveau. Cela fait deux ans que le traitement a débuté et aucun effet secondaire n'est apparu et la destruction du cerveau s'est arrêté.

En 2010 : l'AFSSAP a autorisé l'inclusion d'un nouveau patient thalassémique, il a poursuivi de l'essai.

Dans une phase plus mature, moins médiatisée, plus réfléchie, plus consciente des nombreuses années nécessaires pour que cette idée s'inscrive dans une routine thérapeutique, de nombreuses équipes internationales continuent à travailler pour faire de la thérapie génique un outil supplémentaire à la panoplie des traitements hospitaliers.

Produced with ScanTOPDF

Chapitre I : Le point sur la thérapie génique

Produced with Scantopdf

I-1 Définition de la thérapie génique :

La thérapie génique est une nouvelle approche. Elle consiste à introduire du matériel génétique dans une cellule, dite « cible » (fig 01). Pour compenser l'action de gènes fonctionnant anormalement. (Richard, M .2001) Ceci se fait en plusieurs étapes :

- insertion d'un gène dans un vecteur.
- mise en contact du vecteur et de la cellule à modifier. [7].

I-2- Le principe de la thérapie génique :

Le principe de la thérapie génique repose donc sur la modification du matériel génétique d'un sujet. Celui-ci est supposé être en mesure d'agir au niveau de la cellule à modifier. C'est au cœur de celle-ci que se déroulent les mécanismes de transcription et de production des protéines régulatrices. D'où l'idée d'utiliser un vecteur de transfert permettant l'insertion de gène recombinant dans la cellule, soit *in vivo* (injection dans le système sanguin), soit *in situ* (insertion directement au niveau du tissu ou de la cellule cible). Il existe même des possibilités de travailler directement *ex vivo*, dans ce cas, on extrait des cellules (le plus souvent des cellules sanguines) pour les manipuler au laboratoire, puis celles-ci sont réinjectée au patient. (fig 02) [9]

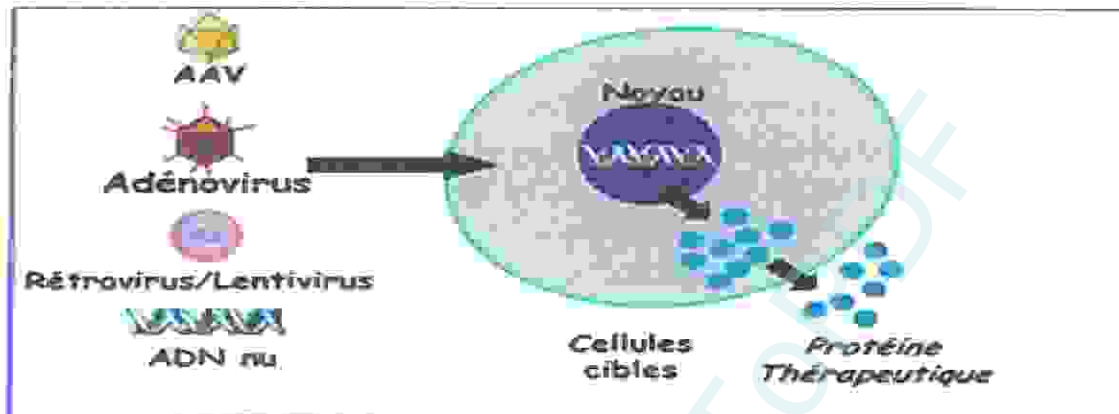


Figure 01 : l'introduction du matériel génétique dans la cellule cible. [8]

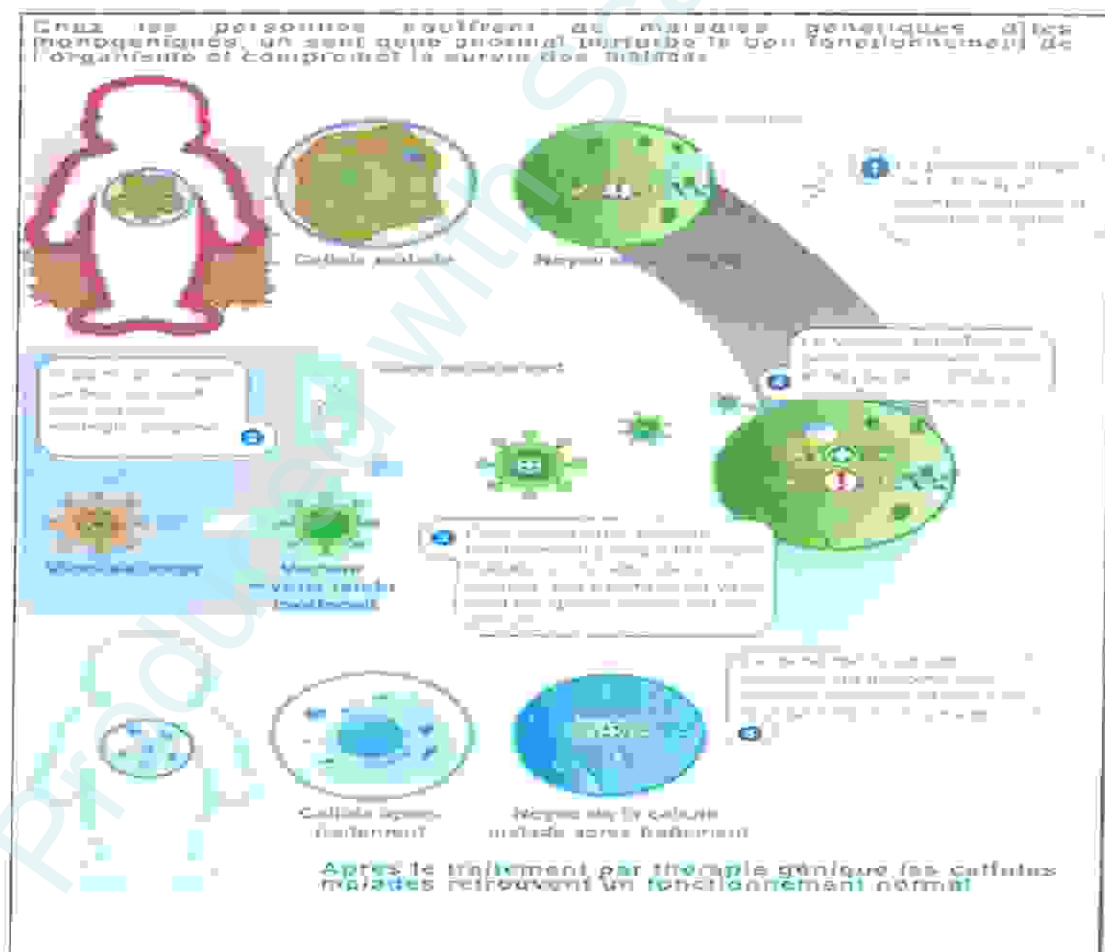


Figure 02 : les étapes de la thérapie génique. [10]

I-3 -Les différentes catégories de la thérapie génique :

Selon les types de cellule affectée, on peut classer la thérapie génique en deux grandes catégories : thérapie de la lignée germinale et la thérapie de la lignée somatique. (Jean, Marie. Werner, Muler-Esterl .2007)

I-3-1-La thérapie génique germinale :

Thérapie génique germinale consiste à modifier toutes les cellules de l'organisme, y compris celles qui donnent naissance aux gamètes. Par conséquent, ce type de thérapie génique affecte non seulement le patient, mais également ses descendants. Le but est alors d'éliminer un mauvais gène d'un être et de toute sa descendance. De cette méthode a été réalisé sur les souris uniquement (pour l'homme ce protocole est en étude). Il consiste à retirer d'une souris pleine, un embryon à un stade précoce du développement (blastocyte) qui présente le génotype déficient et à lui injecté des cellules transgéniques contenant l'allèle de type « sauvage ». Ces cellules forment alors des parties de nombreux tissu de l'organisme. Y compris souvent de la lignée germinale qui donnera naissance aux gonades. Le gène pourra ensuite être transmis à toute ou une partie de descendance, selon la taille du clone des cellules transgéniques présentes dans la zone germinale.[11]

I-3-2- La thérapie génique somatique :

L'approche consiste à essayer de corriger un phénotype de maladie en traitant quelque cellule somatique chez la personne atteinte. Actuellement, il n'est pas possible de rendre un organisme entièrement transgénique. Cette technique s'applique donc aux maladies dont le phénotype est dû à des gènes exprimés de façon prédominante dans un tissu. Dans ce cas, il n'est probablement pas nécessaire que toutes les cellules de ce tissu deviennent transgéniques, une fraction de ces cellules rendues transgéniques pourra atténuer les symptômes de la maladie. [12]

La technique consiste à prélever des cellules d'un malade présentant le génotype déficient et à rendre ces cellules transgéniques, grâce à l'introduction de copie du gène cloné de type sauvage, les cellules transgéniques sont ensuite réintroduites dans le corps du malade et la fonction normale du gène s'y exerce. La thérapie de la lignée somatique est la seule actuellement envisagée pour les êtres humains. [13]

I-4-Les outils de la thérapie génique:

Les cellules, protégées par leur membrane lipidique, sont imperméables à l'ADN. C'est pour cela que nombreuses méthodes ont été mise en place pour introduire un gène dans une cellule. (J. Etienne, E. Clauser, C. Housset. 2007)

Chaque tentative de transfert de gène est unique, car une étude expérimentale entièrement originale doit être conçue et mise en œuvre pour chaque triade gène-vecteur-cellule cible. Il faut d'abord localiser le gène thérapeutique, qui contrera les effets du gène malade. [13]

I-4-I-Localisation du gène thérapeutique :

Pour l'instant on sait juste de quelle protéine on a besoin. D'abord, identifions les 10 premiers acides aminés qui forment cette protéine. Avec les premiers AA qu'on a retrouvés, on peut facilement trouver les dix codons correspondants grâce à la table des codes génétiques.

Maintenant que l'on a les trente premiers nucléotides de notre gène ; il faut les trouver dans le génome de notre organisme donneur, mais retrouver un gène dans tous les chromosomes d'une cellule n'est pas évident. (Jack, Pasternek 2004)

Alors, on va synthétiser leur trente bases complémentaires, on les assemblant dans le bon ordre est pour cela, on va utiliser une sonde (ou des sondes) puisqu'il y a plusieurs codons possible pour former la même protéine) dite « chaud » car on va la rendre radioactif pour pouvoir la retrouver (utiliser le principe de complémentarité).

Le seul problème est que l'on ne trouve l'ARN_m de notre gène que quand il est transcrit, ce qui, chez les organismes supérieurs, n'est le cas que pour quelques cellules, et seulement quand l'organisme a besoin.

Donc, on va mettre en culture de cellules qui produisent naturellement notre protéine et le forcer à produire la protéine en simulant une demande de l'organisme. Ensuite, on lyse les cellules (après la transcription et avant la traduction) et on ajoute notre sonde radioactif qui va fixer sur l'ARN_m (Plus la sonde est grande, moins de chance pour se tromper). Il nous reste qu'à faire une électrophorèse de l'ensemble et passer le résultat sur l'autoradiographie ; pour retrouver l'ARN_m recherché.

Enfin et avec l'enzyme transcriptase inverse on peut produire l'ADN de notre gène.

Pour éviter toute disparition imprévue, il faut mieux faire des copies de ce gène. Et ce à l'aide du fort pouvoir de multiplication qu'à la bactérie. [14]

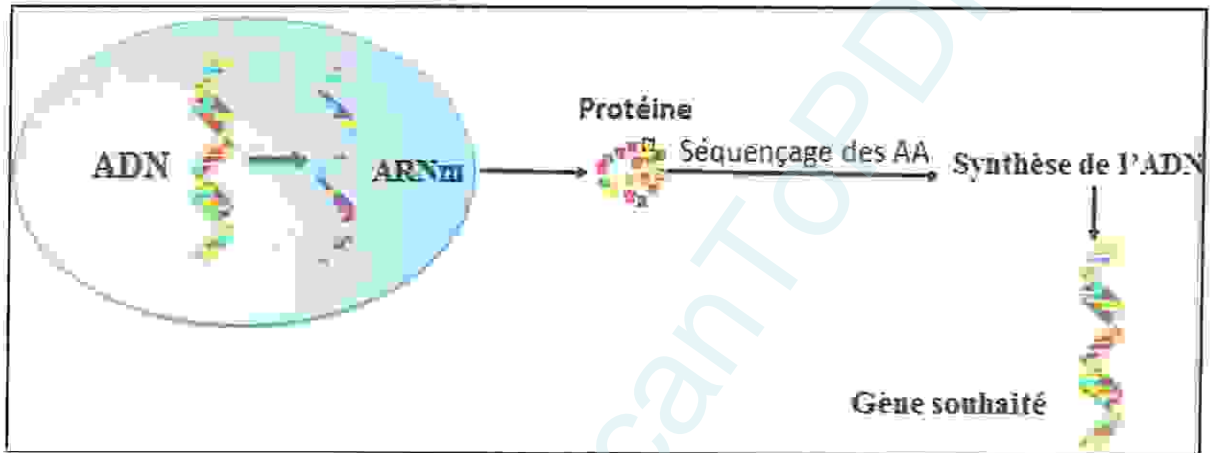


Figure 03: localisation de gène thérapeutique. [14]

I-4-2- mode d'administration :

Pour mener le vecteur thérapeutique jusqu'aux cellules cibles de l'organisme, il existe trois grands moyens d'administrer les vecteurs : [15]

I-4-2-1-La thérapie génique ex vivo: le principe de cette méthode est de prélever les cellules cibles du patient, les mettre en culture dans un laboratoire, les modifier génétiquement et les réinjectées au même patient.

Les modèles cellulaires les plus concernées par ce type de stratégie sont les cellules hématopoïétiques (cellules de moelle osseuse) cette stratégie permet d'éviter la nocivité de la réponse immunitaire du patient.

I-4-2-2-La thérapie génique in situ: consiste à placer le vecteur directement dans le tissu touché. Ce processus est employé pour traiter la mucoviscidose (fibrose kystine) (par infusion directe du vecteur dans les bronches et poumons), détruire les tumeurs (exp : cancer du cerveau) et traiter la dystrophie musculaire.

I-4-2-3-La thérapie génique in vivo: consiste en l'injection d'un vecteur dans le courant sanguin. Celui-ci peut trouver et insérer de nouveaux gènes uniquement dans les cellules pour lesquelles il a été spécialement conçu. Bien qu'il n'existe actuellement aucun traitement *in vivo* disponible, une percée dans ce domaine rendra cette thérapie génique forte attrayante (fig 15). [09]

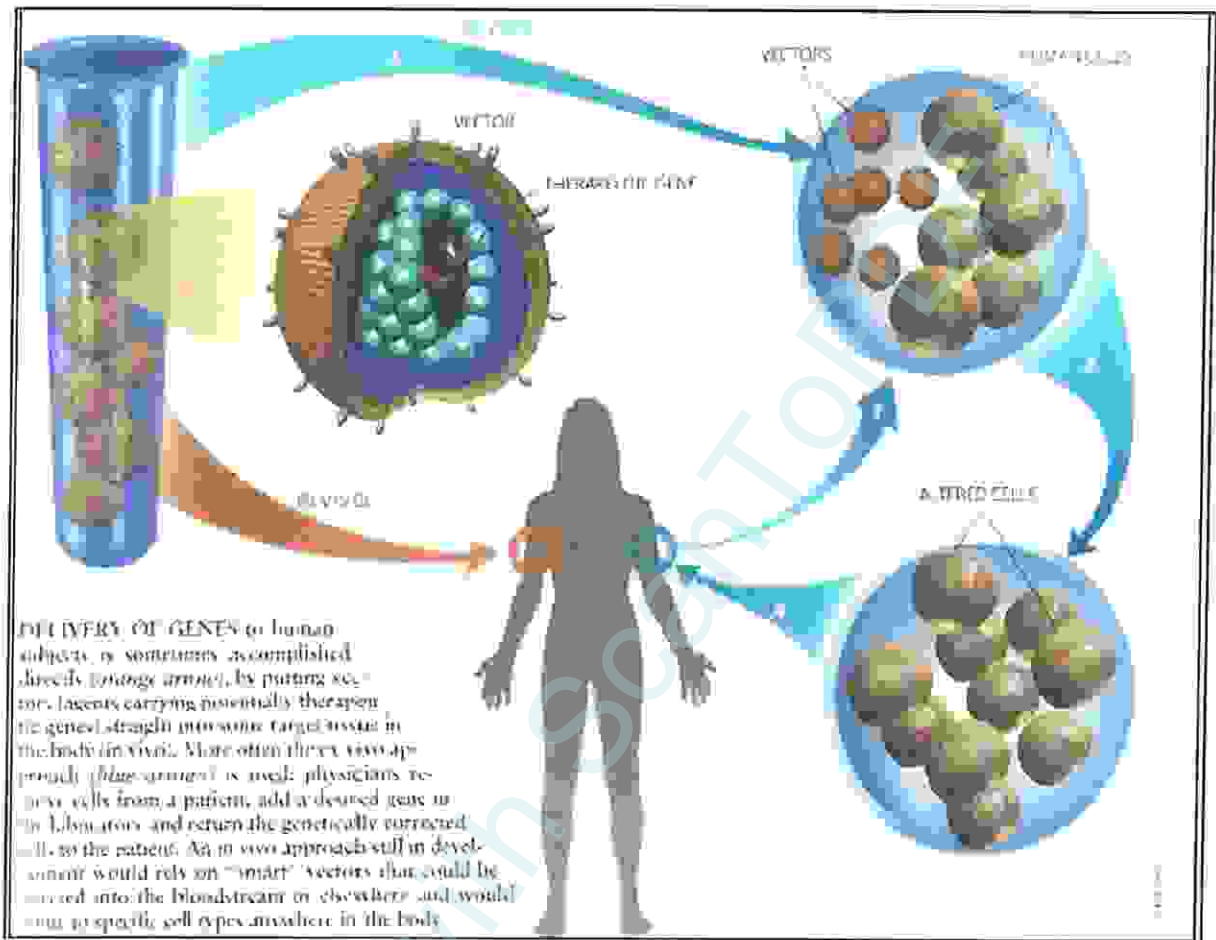


Figure 04 : Les modes d'administration du gène thérapeutique. [16]

I-4-2-les vecteurs :

Un vecteur est simplement un « transporteur » de matériel génétique. Il permet la pénétration et l'intégration de nouveaux gènes dans le génome de la cellule cible. Les vecteurs doivent être administrés à des types de cellules cible particulières. Ils doivent bien entendu être modifiés pour qu'il n'existe aucun risque pathogène direct ou indirect et pour qu'ils ne puissent pas se reproduire dans les cellules humaines. [05]

Les vecteurs utilisés en thérapie génique peuvent être repartis-en :

I-4-2-1- vecteurs viraux :

Les virus sont composés de matériel génétique (ADN ou ARN) entouré d'une couche protectrice formée de protéines et parfois d'autre type de molécules également. [5]

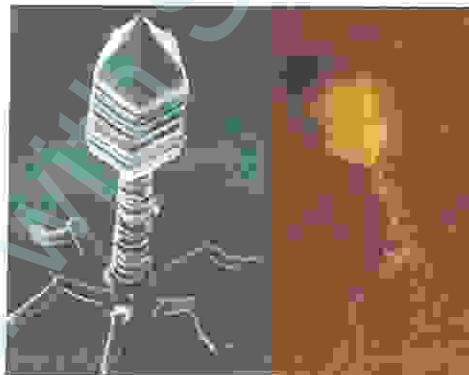


Figure 05 : Virus. [17]

Ils constituent d'excellents vecteurs et ils peuvent insérer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines et en terme de longues période d'évolution, ils ont acquis la capacité d'éviter d'être détruits par le système immunitaire humain. (18)

I-4-3-1-1-La construction d'un vecteur viral :

Pour piéger le virus, les scientifiques gardent la couche virale extérieure, mais modifient le matériel génétique interne, ils enlèvent les gènes délétères et les remplacent par des gènes thérapeutiques. Maintenant, le virus n'est plus pathogène (il ne peut plus nuire à la cellule qu'il infecte) et incapable de se reproduire. [11]

Pour construire un vecteur viral contenant un gène thérapeutique, les chercheurs vont demander à des cellules de le fabriquer à partir de bouts d'ADN (plasmides). [1]

-Trouver et construire les bons plasmides :

Les plasmides utilisés pour la construction d'un vecteur viral contenant un gène thérapeutique sont des bouts d'ADN double brins qui renferment des informations génétiques précises, les unes ne concernent que le vecteur, les autres le gène-médicament. Ainsi, pour produire un vecteur de type $\Lambda\Lambda V$ (adeno associated virus), il faut trois plasmides différents. L'un contient les gènes nécessaires à la production de l'enveloppe (capside) du virus. Le deuxième contient les gènes qui servent à la multiplication (réplication) du virus. Le troisième port le gène thérapeutique. Pour un vecteur de type HIV, il faudra 4 plasmides. Dans tous les cas, le virus obtenu ne ra pas un virus « normal » puisqu'il sera dépourvu de ses éléments nuisible à la sante.

Aujourd'hui, pour obtenir les plasmides qui donneront le vecteur Il suffit aux chercheurs de de s'adresse à des sociétés spécialisées dans leur production. En revanche, dans le catalogue des plasmides, il leur faut choisir ceux qui donneront naissance au vecteur qui ne sera fonctionnel que dans un type de cellules données. Par exemple, si l'objectif des chercheurs est de soigner les muscles, il s'agira que le vecteur ne s'exprime que dans les cellules musculaires et soit totalement « silencieux » dans tout le reste de l'organisme.

Pour obtenir le plasmide porteur du gène thérapeutique, l'opération est un peu plus complexe. Dans un premier temps, les chercheur prélèvent le gène-médicament dans de l'ADN de cellules. Ensuite, ils doivent l'introduire dans « une cassette d'expression ». Derrière ce terme, se cache encore un plasmide qui est pourvu de toutes les informations génétiques qui permettront à la cellule qui recevra le gène thérapeutique de transcrire celui-ci. Là encore, pas question que le gène s'exprime n'importe où dans l'organisme, la cassette d'exprime est donc spécifique d'un type cellulaire.

En pratique, pour construire ce plasmide contenant le gène-médicament, les chercheurs commencent par couper, à un endroit précis, les cassettes d'expression grâce à des enzymes qui sont des sortes de protéines « ciseaux ». ils ajoutent ensuite le gène thérapeutique et

d'autres enzymes qui cette fois servent de « colle » et permettent au gène de se lier aux cassette d'expression. (fig 06)

-Trier et conserver les plasmides

Afin de conserver les différents plasmides ceux chargés de produire le vecteur et ceux porteurs du gène thérapeutique, les chercheurs vont les introduire dans des bactéries. Chaque plasmide aura sa propre culture bactérienne. Cependant, comme souvent en matière de production de matériel biologique, les réactions ne fonctionnent pas à 100%. ainsi, au côté des plasmide, il subsiste des cassettes d'expression et des gènes thérapeutiques, des cassettes qui se sont « refermées » sans le gène, des gènes mal placés... autant de déchets dont les chercheurs vont devoir se débarrasser.

Pour effectuer ce tri, les bactéries qui sont censées avoir « ingurgité » les plasmides sont mis en culture avec un antibiotique qui ne détruira que celles qui ne sont pas « protégé » par les plasmides. Grâce à ce procédé, les chercheur repère les « bonnes » bactéries qui sont celles qui ont proliféré. Ils prennent alors ces bactéries renferment les plasmides et les font se multiplier, toujours en présence d'antibiotique car pour survivre à celui-ci la bactérie doit impérativement garder les plasmides. Lorsqu'une quantité suffisante est obtenue, les bactéries peuvent être congelées ou utilisées immédiatement pour produire le vecteur porteur du gène médicament. (fig 07)

-Obtenir les vecteurs viraux contenant le gène thérapeutique

Pour obtenir les vecteurs viraux contenant le gène thérapeutique, les chercheurs servent de cellules dont la machinerie va transcrire et traduire les plasmides au même titre que ses propres gènes.

Dans un premier temps, les bactéries sont lysées afin de libérer les différents plasmides. Les uns sont chargés de donner naissance au vecteur, les autres sont porteur des gènes thérapeutiques. Tous ensemble, ils sont mis en contact avec des cellules avec lesquelles ils vont pénétrer. Les cellules ainsi transfectées vont ensuite fabriquer les vecteurs viraux contenant les gènes thérapeutiques. (fig 08)

Après leur libération des cellules, les vecteurs seront filtrés, purifiés, stérilisés, afin d'obtenir une solution ne contenant que des vecteurs renfermant le gène-médicament.

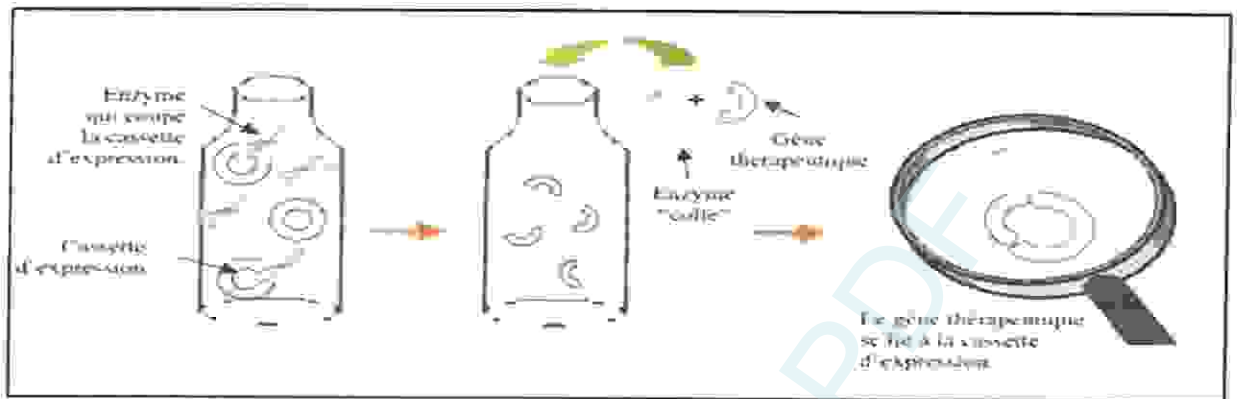


Figure 06 : la liaison de gène thérapeutique avec la cassette d'expression. [19]

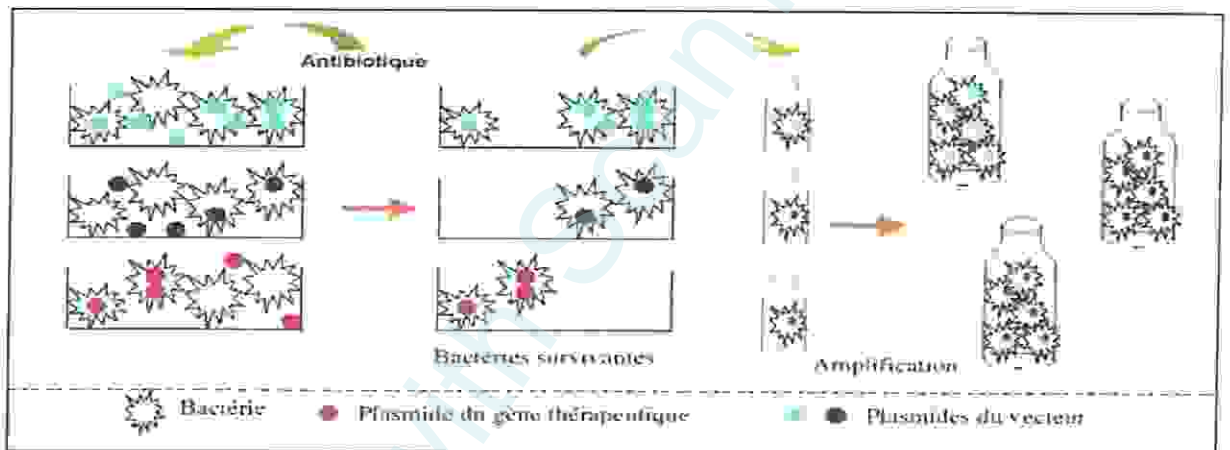


Figure 07 : conservation des plasmides. [19]

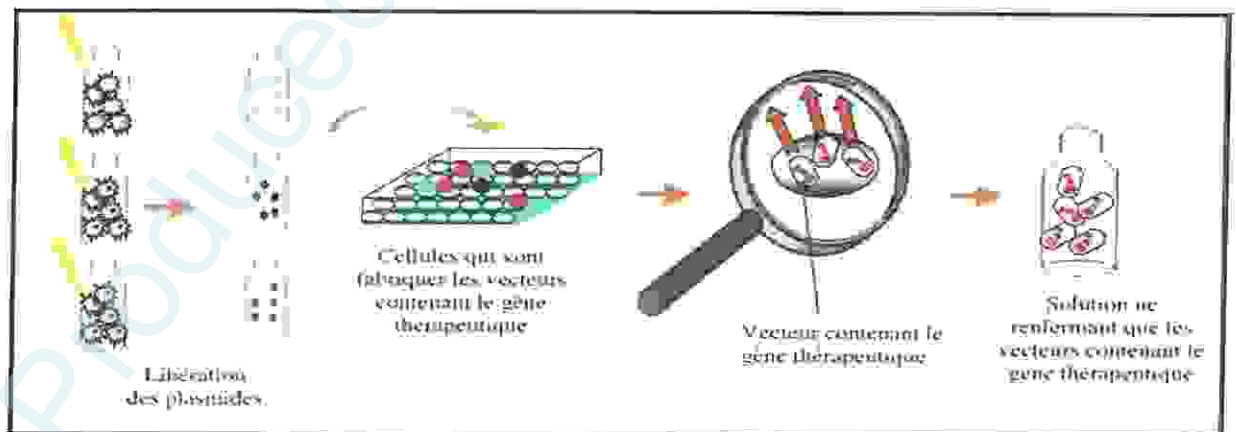


Figure 08: les vecteurs viraux contenant le gène thérapeutique. [19]

Parmi les vecteurs viraux on peut trouver :

1-4-3-1-2- rétrovirus :

Les vecteurs dérivés des rétrovirus ont été les premiers utilisés pour entreprendre les premières expériences de thérapie génique. Ils sont généralement dérivés des rétrovirus de la leucémie murine (MLV) (J, Etienne et al.2007). Ce type de vecteur a été utilisé pour traiter plusieurs maladies, notamment certain forme de déficit immunitaire combiné sévère. (Jack,J .2004)

Une particule rétrovirus de type sauvage porte deux génomes identiques d'ARN simple brin de taille 8 kb [fig 09], chacun étant organisé en six régions. En partant de l'extrémité 5', chacune de ces régions est constituée d'une longue répétition terminale 5' LTR, d'une séquence non codante nécessaire à l'encapsulation du brin d'ARN au cours de la formation de particules virales appelée « psi⁺ », de trois gènes codant : une protéine de structure de l'intérieure de la capsid « gag », les fonctions transcriptase inverse « Pol », et intégrase « env. » et d'une séquence 3' LTR.

Tout d'abord, la plus grande partie de l'extrémité 3' du gène « gag » et la totalité des gènes « Pol » et « env. » sont éliminées, grâce aux sites endonucléasique de restriction. Grâce à une digestion exonucléasique limitée, Les régions contenant la partie 5' de gène « gag » et les 5' et 3'-LTR sont en revanche conservées. En suit, un gène thérapeutique est cloné à côté de la région « psi⁺ » et sa transcription sera contrôlée par le promoteur contenu dans la séquence 5' LTR, quel que soit la construction, la limite supérieure de la taille de l'ADN cloné que peut porter un vecteur rétrovirus est d'environ 8 Kb. (Fig 10)

Le rétrovirus modifié est introduit dans les cellules d'emballage, ce sont des cellules eucaryotes que l'on a génétiquement modifié pour qu'elles contiennent au leur génome les gènes « gag » « pol » et « env » ; ces cellules de complémententation vont transcrire activement le rétrovirus modifié, et fourniront les protéines de capsid et d'enveloppe ainsi que la rétrotranscriptase.

Après l'assemblage, les particules virales sont libérées dans le milieu extérieur. Ces rétrovirus recombinant seront ajoutés aux cultures de cellules humaines modifiées. (Lynn, Jorde. Johns, Cary, Michael, Banshad. 2004)

Par sécurité, les cellules d'empaquetages ont été rendues défectives et ne peuvent se multiplier.

-Les inconvénients :

-Dans la mesure où la plus part des rétrovirus ne peuvent pénétrer dans le noyau qu'à condition que la membrane nucléaire se rompe au cours de la division cellulaire. Les rétrovirus ne peuvent donc pas être utilisés pour traiter des cellules comme les neurones et les cellules de l'épithélium pulmonaire. [20]

-Ils sont surtout adaptés à une utilisation ex vivo, ce qui n'est pas toujours réalisable en fonction des pathologies.

-La taille de transgène est limitée à 8kb alors que de nombreux gènes humains ont une taille supérieure.

-Le génome proviral peut s'intégrer n'importe où dans l'ADN. Un risque potentiel existe donc, que l'insertion inactive un gène important ou se fasse dans ou à proximité d'un gène impliqué dans la cancérisation. Une étude clinique récente a malheureusement confirmé que ce risque est bien réel, plusieurs enfants atteints d'une maladie génétique grave ayant développé leucémie suite à une thérapie génique rétrovirale. (J, Etienne et al.2007)

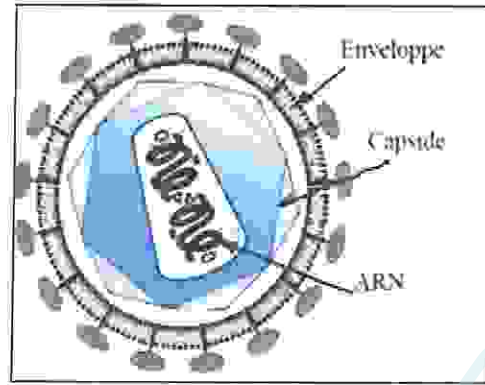


Figure 09 : Un rétrovirus. Virus à ARN avec enveloppe lipidique. [14]

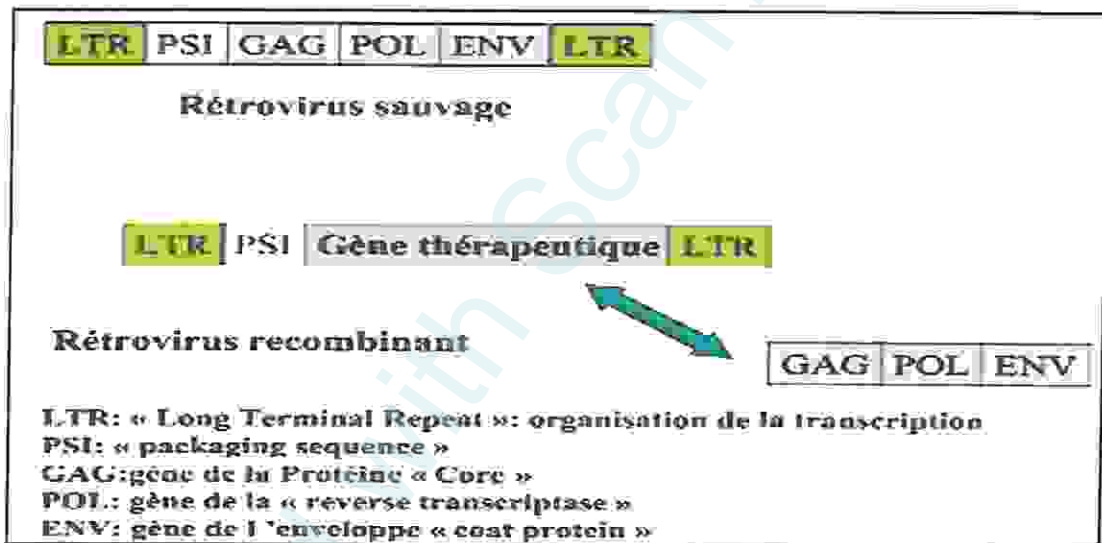


Figure 10 : construction d'un rétrovirus sauvage et d'un rétrovirus recombinant [14]

1-4-3-1-3- Adénovirus :

Du fait de l'incapacité de la plus part des rétrovirus à infecter des cellules qui ne se divisent pas, d'autres systèmes d'insertion n'ont pas cette limitation ont été explorés. L'un des principaux exemples, est celui de l'Adénovirus. (Lynn, J et all .2004).

Un adénovirus est un virus à ADN double brin d'environ 36 kb, associé à des protéines et entouré d'une capsid (fig 11). L'emploi de ce vecteur est intéressant car les virus, dont ils sont issus ont un tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures. Ils sont fréquents et ne sont responsables que de rhumes. (J, Etienne et all,2007)

On utilise un adénovirus humain dont les gènes E1 et E3 indispensable à sa réplication, ont été délétés et remplacés par la séquence génique thérapeutique. On produit cet adénovirus recombinant *in vitro*, en infectant des cellules humaines en culture qui possèdent les gènes E1 et E3, autorisant ainsi la production de l'adénovirus recombinant. (fig 12)

Plus de 99% des particules virales libérées contiennent la molécule d'ADN avec le ou les gènes thérapeutiques. [15]

-Les inconvénients :

-L'inconvénient majeur de ces adénovirus est leur toxicité. En effet, il a été montré qu'ils déclenchent des réponses inflammatoires au site d'administrations. Par exemple des réponses inflammatoires dans les voies aériennes des patients souffrant de mucoviscidose.

-Ils peuvent être immunogènes et provoquent une réaction immunitaire qui diminue l'efficacité du vecteur. « Des recherches actuelles portent sur adénovirus « gutless » dont presque tout le génome viral est retiré. Cette technique devrait réduire la réaction immunitaire, et Permettre l'insertion de segment d'ADN humain plus large (jusqu'au 36kb) ». [21]

-L'absence d'intégration constitue un inconvénient dans la mesure où les adénovirus peuvent éventuellement être inactivés, ce qui entraîne une expression transitoire du gène, et la nécessité réintroduire le vecteur ; ce qui signifie que les gènes ajoutés ne sont pas efficace que temporairement. (Jack, J .2004)

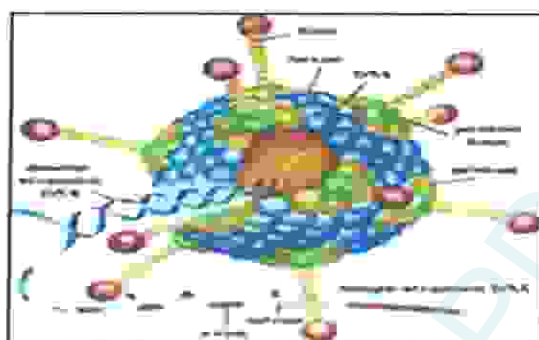


Figure 11 : Un adénovirus. Virus à ADN sans enveloppe. [19]

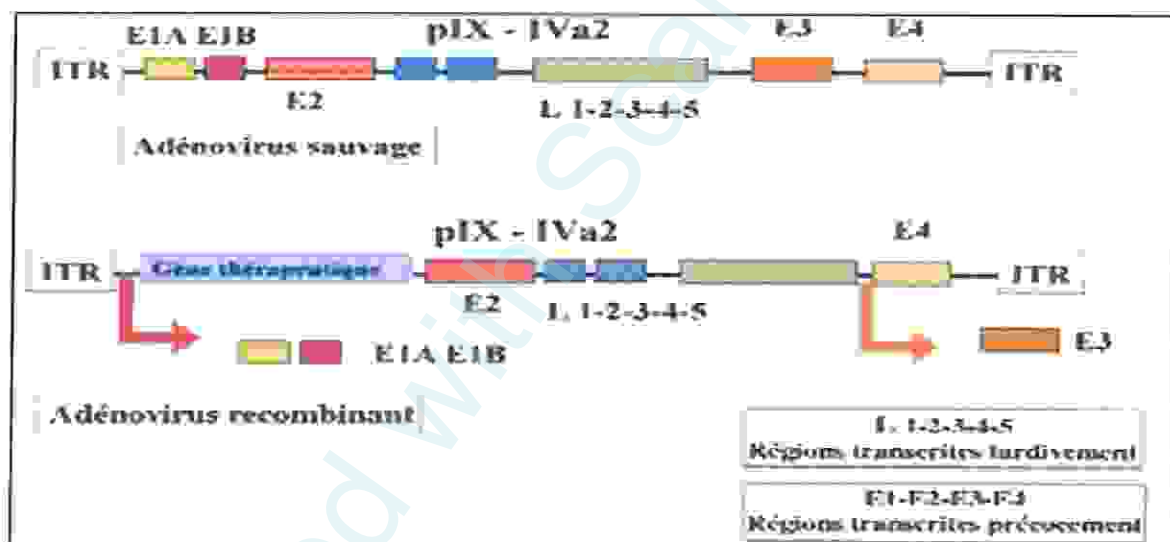


Figure 12 : construction d'un adénovirus recombinant. [14]

1-4-3-1-4- Adéno-associés (AAV) :

Ce sont de tout petits virus non pathogènes à ADN, de la famille des parvovirus humain (4,7 kb) (fig 13). Pour se répliquer, ils ont besoin de virus auxiliaires (dite helper), tels que les adénovirus. Ils peuvent infecter des cellules qui ne sont pas en cours de division et ils peuvent être délivrés à de nombreux organes par injection *In vivo*. Ils offrent l'avantage essentiel de ne provoquer pratiquement aucune réponse immunitaire ni de réaction inflammatoire. (J. Etienne et all. 2007)

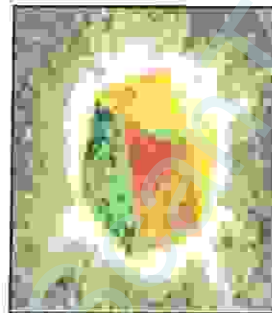


Figure 13 : vecteur adéno-associée (AAV). [17].

L'absence de pathogénicité fait de virus adéno-associé un bon candidat comme vecteur de distribution de gène thérapeutique.

Le virus recombiné adéno-associé est produit par la cotransfection de deux plasmides dans une cellule hôte infectée par adénovirus (virus assistant). L'un des plasmides porte un gène thérapeutique des répétitions terminales inversées (125Pb) chacune du virus adéno-associé. Le deuxième plasmide contient des deux gènes du virus adéno-associé (*rep*, *cap*) responsables respectivement de la répllication du génome et de la production de sa capsid. Après la lyse des cellules hôtes infectées, les particules recombinées du virus adéno associé sont purifiées puis séparées des adénovirus par centrifugation et dialyse. Tout adénovirus résiduel dans l'échantillon est tué par un traitement par la chaleur. (Lynn, J et all. 2004)

L'une des principales limites à l'utilisation des AAV est la taille très restreinte du transgène qui est limitée à 5 kb.

La capacité de vecteur AAV à introduire un gène dans une cellule et de permettre son expression dépend du succès de trois étapes :

- La pénétration de la particule virale à l'intérieur de la cellule qui se fait essentiellement par endocytose.
 - Le transport de génome recombinant jusqu'à l'intérieur du noyau, dont la durée varie de trente minute à quelques heures. Une fois dans le noyau, le génome viral simple brin doit être converti en double brin pour former des matrices utilisables par la machinerie de transcription cellulaire.
 - La mobilisation de fonction cellulaire pour l'expression et le maintien de transgène.
- (Jack, J .2004)

1-4-3-1-5-Autre vecteurs viraux :

-Les vecteurs **Lentivirus** : sont des rétrovirus complexes qui contrairement aux rétrovirus simples, peuvent pénétrer dans les cellules qui ne se divisent pas, par les pores de la membrane nucléaire. Les vecteurs lentivirus, sont souvent dérivés du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain), ou d'autre lentivirus non humain (FIV : groupe de lentivirus infectant le chat; EIAV : groupe de lentivirus infectant le cheval ; SIV : groupe de lentivirus infectant le singe) (fig 14). (Lynn, J et all.2004)

Ces vecteurs peuvent être infectés **in vivo**, ou **ex vivo**, et ont été notamment utilisés pour améliorer le transfert de gène dans des cellules souches hématopoïétiques. (Jean, M et all.2007)

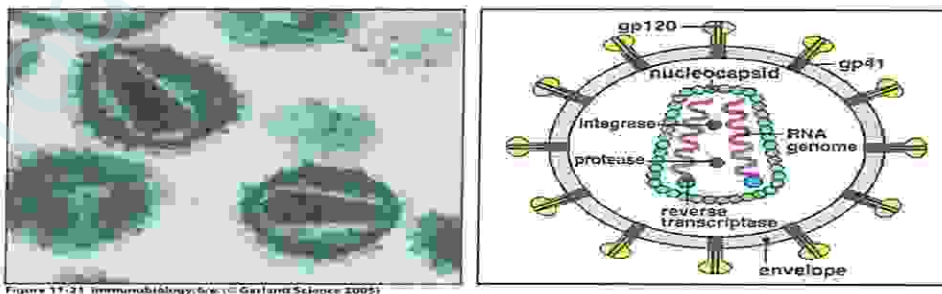


Figure 14 : type de virus utilisé : Lentivirus. [17]

-Ces inconvénients :

-Les inconvénients des lentivirus sont principalement la taille limitée du transgène (8Kb).

-Ces vecteurs sont de développement récent et on manque donc encore de recul pour juger de leur fiabilité.

Ils représentent cependant vraisemblablement les vecteurs viraux d'avenir, en combinant les avantages des rétrovirus classiques (intégration) et des adénovirus (infection des cellules quiescentes). (J, Etienne et all.2004)

-Le virus Herpès Simplex : est un virus qui possède un grand génome (152Kb) d'ADN double brin linéaire contenant au moins 84 gènes contigus dont la moitié n'est pas essentielle à la réplication viral. Ceci fait de HSV, un vecteur pouvant accepter de très grands transgènes (30Kb). [6]

Ces vecteurs peuvent être produits en grande quantité par des cellules de complémentations. Les virus herpès présentent un neurotropisme qui est mis à profit pour la thérapie génique intéressant les neurones sensoriel. Ils ont été utilisés dans des traitements des modèles animaux de Cancer (gliomes) ou des maladies démyélinisantes. Les vecteurs viraux dérivés d'HSV sont prometteurs pour le transfert de gène *in vivo* du fait de leur capacité à persister dans un état de latence après une première infection. [22]

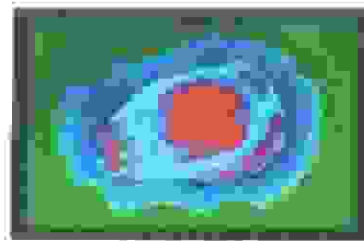


Figure 15: *type de virus utilisé : Herpès simplex.* [17]

- Ces inconvénients :

Les principaux inconvénients sont le manque d'expression concernant leur utilisation, et le fait que l'expression à long terme du transgène soit difficile dans certains types cellulaires.

La fiabilité et l'efficacité de ces vecteurs reste donc à prouver. (J, Etienne et all. 2007)

I-4-3-2-Les vecteurs non viraux :

Bien que les vecteurs viraux fournissent l'avantage d'un transfert de gène efficace dans les cellules, les inconvénients indiqués ont poussé les chercheurs à étudier d'autres types de vecteurs non viraux tels que : (Lynn, J et all. 2004)

I-4-4-3-2-1-Liposomes :

Les liposomes sont des petites vésicules creuses de molécules lipidiques, capable de véhiculer de l'ADN en elle. Un liposome peut fusionner avec la membrane cellulaire, libérant son contenu dans la cellule. L'ADN plasmidique contenant le gène thérapeutique est incubé avec les liposomes vides ; l'ADN chargé négativement se lie aux liposomes chargé positivement, et les plasmides sont absorbés. Les liposomes contenant l'ADN plasmidique s'appellent **lipoplexes**. Les lipoplexes peuvent ensuite pénétrer dans les cellules ciblées et y introduire l'ADN thérapeutique. Les liposomes ne sont pas aussi efficaces que les vecteurs viraux pour introduire des gènes dans des cellules. Pour améliorer leur efficacité, les scientifiques tentent d'intégrer certaines protéine virales dans les surfaces extérieures des lipoplexes ; en particulier, les protéines virales qui reconnaissent certaines molécules à la surface de la cellule hôte et s'y lient. (fig 16) (Carriere, Mari.2002).

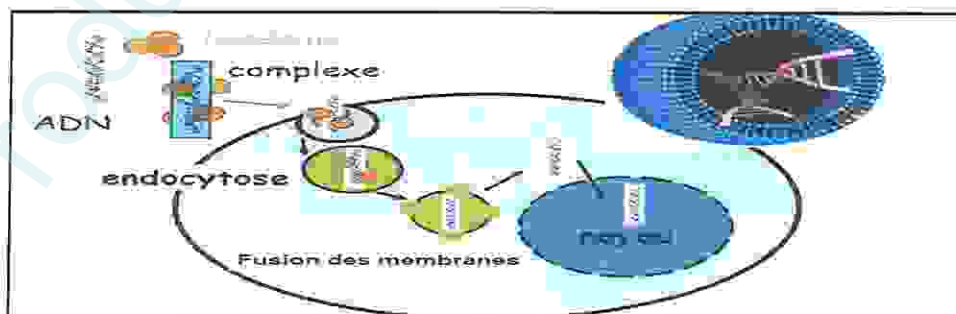


Figure 16 : Transfert de l'ADN par les liposomes. [17]

-Les inconvénients :

-Leur principal inconvénient est qu'il ne possède pas l'efficacité de transfert des virus.

-La plupart des lipoplexes sont dégradés dans le cytoplasme, et ceux qui ne le sont pas sont généralement incapables de pénétrer dans le noyau. [26]

I-4-4-Les méthodes physiques :

I-4-4-1- L'injection de l'ADN plasmidique:

Il est possible d'insérer directement un ADN plasmidique dans des cellules sans utiliser aucun vecteur de transfert.

La possibilité que l'ADN plasmidique injecté dans les muscles puisse stimuler la production d'une protéine thérapeutique par ces cellules musculaires, cette protéine pourrait ensuite être sécrétée dans le courant sanguin et le reste du corps. (fig 17)

Des tentatives sont actuellement à l'étude pour utiliser un ADN « nu » comme « vaccin » susceptible de coder pour une protéine pathogène contre laquelle l'organisme élaborera une réponse immunitaire. [7]

I-4-4-2-L'électroporation:

L'électroporation utilise des impulsions de champ électrique pour faire des pores microscopiques dans les membranes cellulaires. Ces pores sont aussi appelés « électropores ». Leur présence permet aux molécules de passer de part et d'autre de la membrane. Les électropores sont localisés préférentiellement sur les surfaces cellulaires proches des électrodes. Si l'impulsion électrique a été donnée avec de bons paramètres, alors la cellule « électroporée » va retrouver son intégrité (les électropores se referment spontanément) et les cellules vont continuer leur croissance. Le temps de formation des électropores est de quelques microsecondes, le temps de fermeture des pores est de quelques minutes. (fig 18) [4]

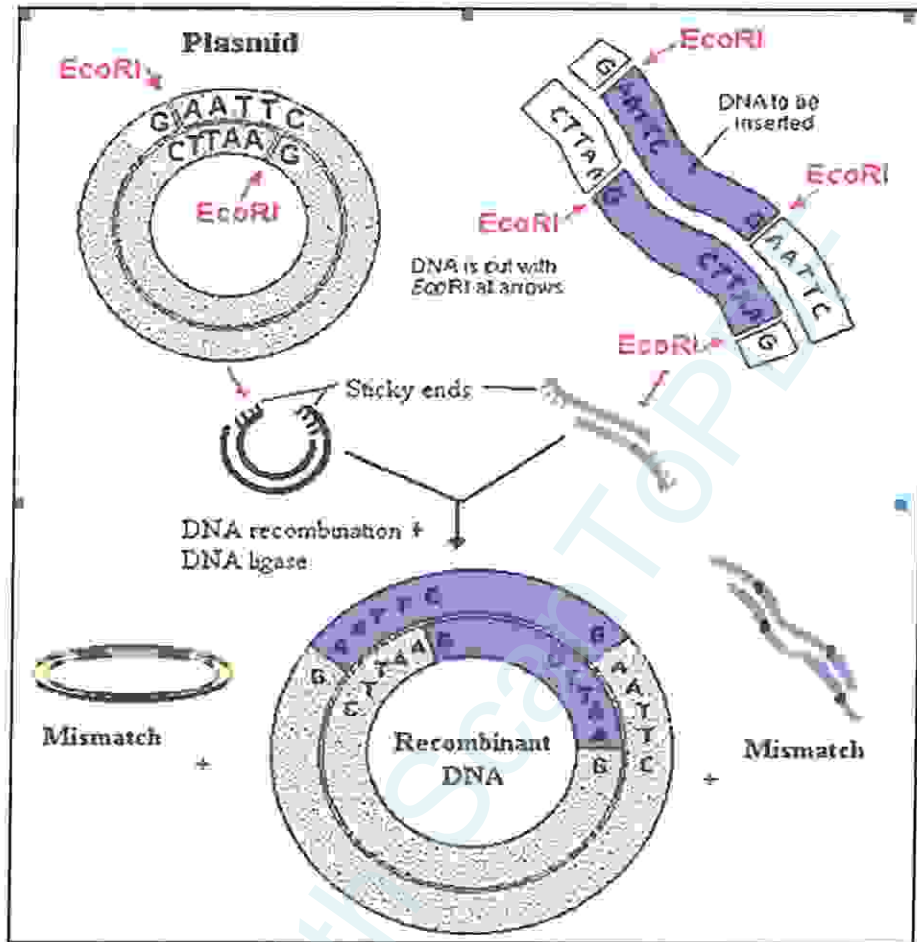


Figure 17: Injection d'ADN plasmidique. [17]

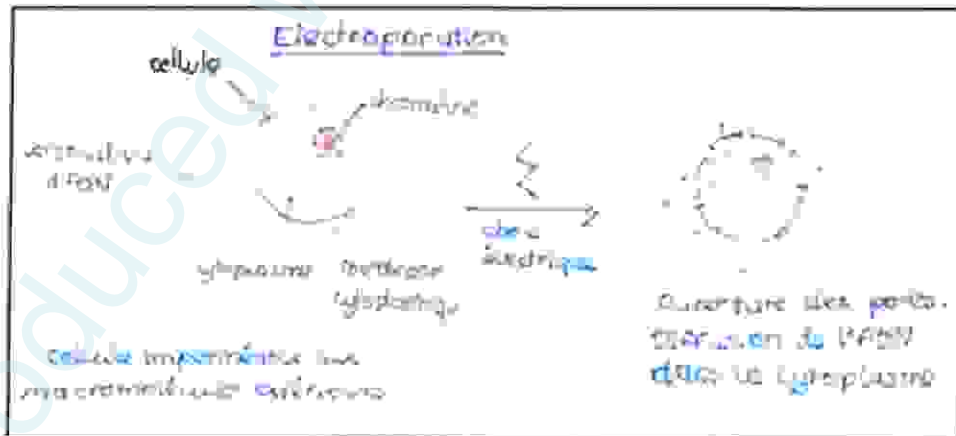


Figure 18 : l'électroporation. [4]

I-5-Traitement par inhibition des gènes :

Pour de nombreuses maladies génétiques, le blocage de la synthèse du produit d'un gène pourrait être bénéfique, (Lynn, J et all .2004) elles comprennent l'utilisation de :

I-5-1-La thérapie Anti-sens :

Un médicament anti-sens est un oligonucléotide (une chaîne monocaténaire relativement petite de nucléotide), complémentaire à un petit segment de la molécule cible d'ARNm.

Le principe de thérapie anti-sens est simple : ses médicaments interagissent avec l'ARNm anormal, ceci le rend (ARNm) illisible pour le ribosome et aucune protéine pathogène n'est traduite.

On peut également concevoir des oligonucléotides anti-sens afin de se lier à l'ADN double brin contenant la mutation pathogène, créant une triple hélice qui ne peut pas être transcrite en ARNm. (fig 19) [16]

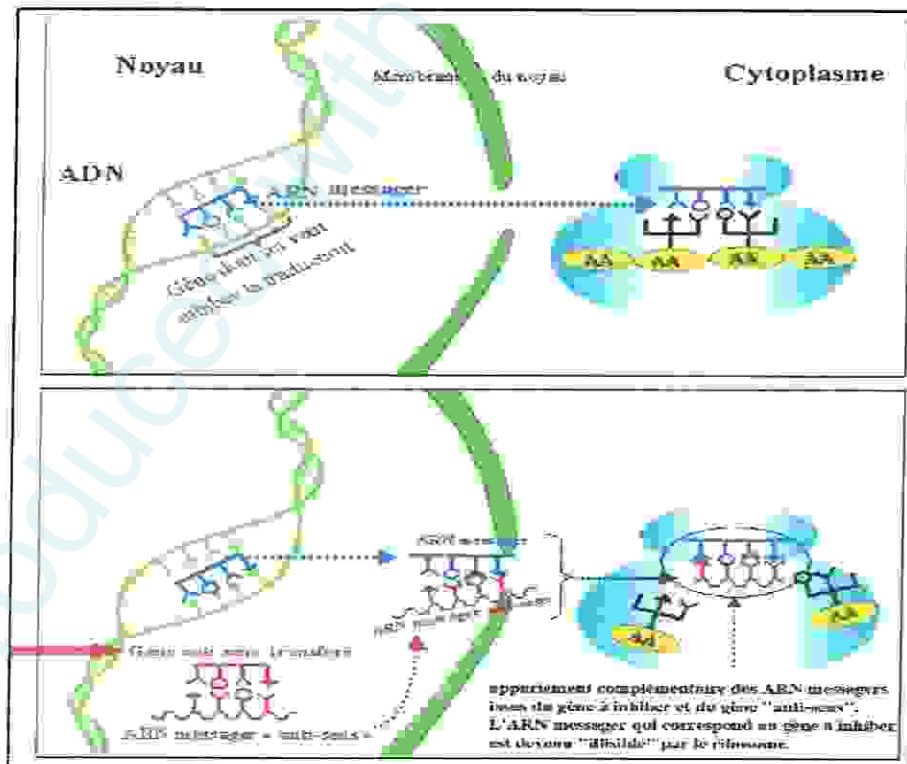


Figure 19 : Stratégie anti-sens de thérapie génique. [16]

-Les limites de la technique :

L'un des difficultés de cette technique provient du fait que les oligonucléotides sont souvent dégradés avant qu'ils ne puissent atteindre leur cible.

En raison de la variation de forme de la molécule d'ADN ou d'ARN cible, l'oligonucléotide anti-sens peut ne plus être capable de se lier à sa séquence complémentaire. (Lynn, J et all.2004)

I-5-2-Thérapie par Ribozyme :

Les ribozymes sont des molécules d'ARN catalytique qui existent à l'état naturel (ARN enzymatique) et possèdent des domaines séparés pour la catalyse et pour la fixation du substrat. Certaines d'entre elles ont la capacité de cliver l'ARNm. Elles peuvent être synthétisées pour interrompre des séquences d'ARNm spécifiques qui contiennent une mutation, ce qui permet de les détruire avant qu'elles ne puissent être traduites en protéine. La thérapie par les ribozymes a été testée par exemple pour empêcher la surexpression du facteur de croissance épidermique de type 2, une substance caractéristique de nombreuses tumeurs du sein. (fig 20) [9]

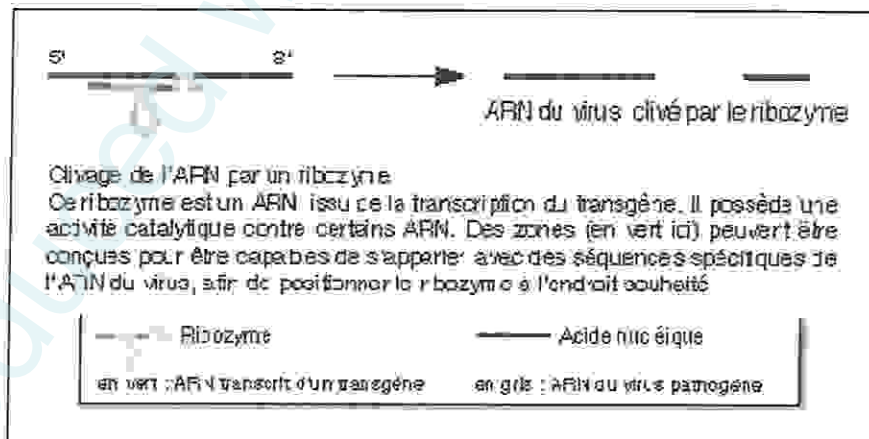


Figure 20 : thérapie par ribozyme. [21]

I-6-Les maladies candidats au traitement par thérapie génique :

Il y a quelques années, on croyait que la thérapie servirait uniquement à remplacer un gène défectueux et à corriger des maladies héréditaires ; toutefois, pour l'instant la majorité des essais cliniques de nos jours se fait sur des patients atteints de maladies acquises. (J, Etienne et al 2007)

Les principales classes de maladies concernées sont les suivantes :

- Le cancer : plusieurs stratégies de thérapie génique ont été pensées pour lutter contre le « cancer », certain vise directement les cellules cancéreuses afin de limiter leur prolifération ou bien de les éliminer.
- Le sida, les anémies héréditaires et les déficits immunitaires combinés sévères... etc

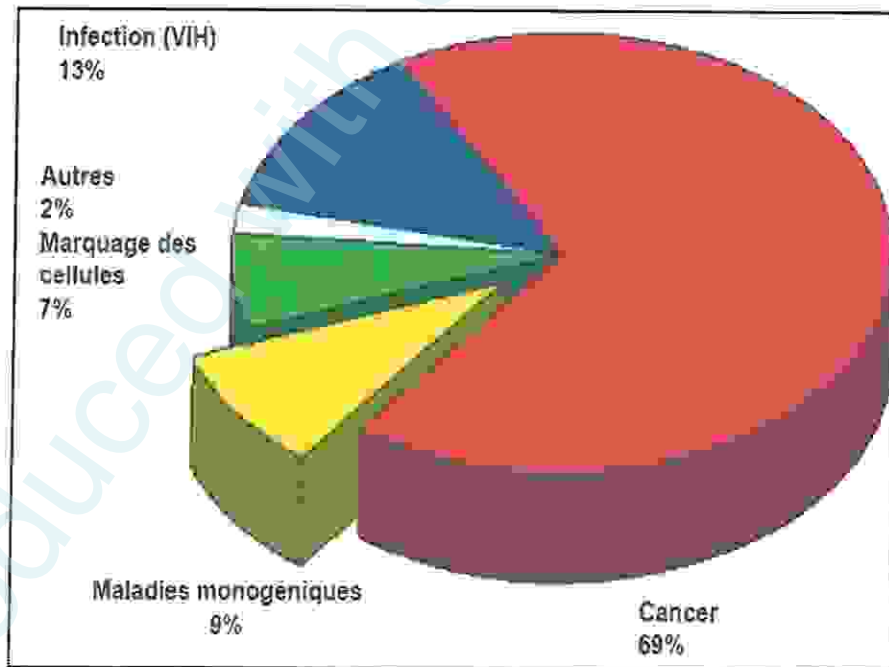


Figure 21: les différentes maladies pour lesquelles on a utilisé la TG. (21)

Chapitre II : les syndromes thalassémiques

Produced with ScantOPDF

Avant de commencer l'étude détaillée des syndromes thalassémiques, on doit d'abord donner des généralités sur l'hémoglobine.

II-1-Généralités sur l'hémoglobine humaine:

L'hémoglobine est pigment respiratoire chromoprotéique soluble dans l'eau. Il constitue 33% du poids d'un globule rouge. C'est une protéine tétramérique de poids moléculaire 64500 daltons, composée de 600 acides aminés disposée sous formes de quatre chaînes polypeptidiques identiques $2\alpha 2, \alpha$ et β . (Fig 22)

L'hémoglobine résulte de l'union d'une fraction non protéinique, appelée "Hème"; avec une fraction de nature protéinique, la "Globine". Son rôle est le transport de l'oxygène du milieu extérieur vers les cellules. Elle est également responsable du transport de 40% du CO₂ des tissus vers les poumons. [23]

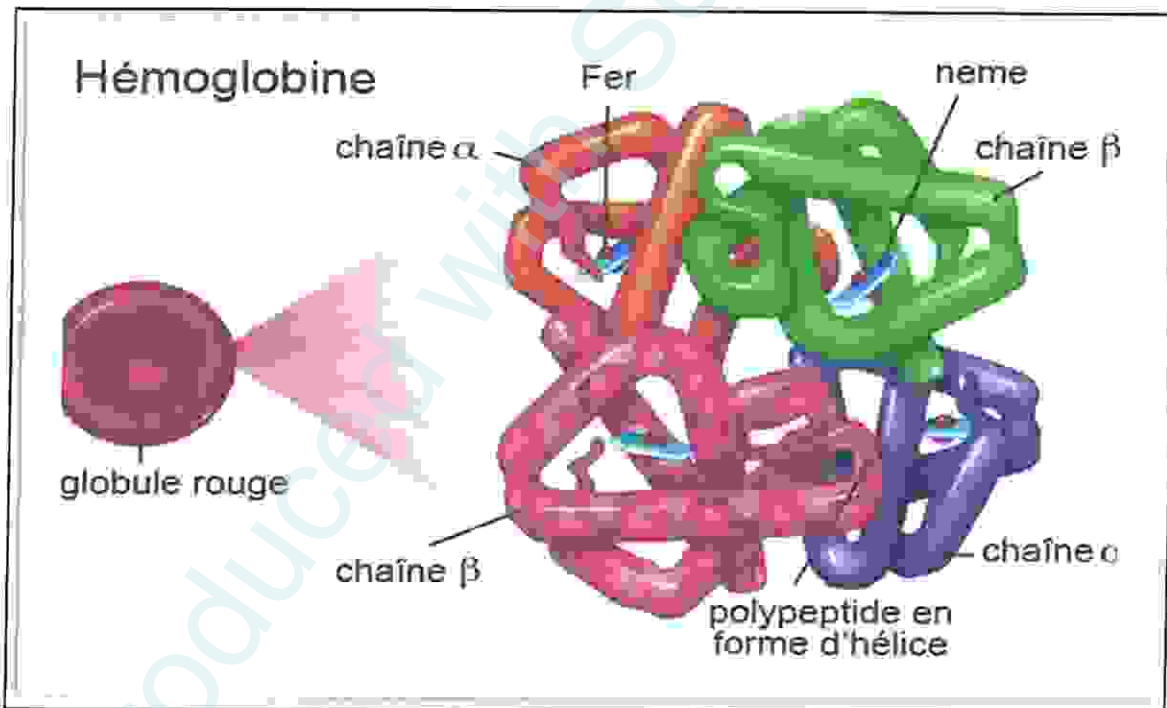


Figure 22 : la structure de l'hémoglobine. [23]

II-1-1-L'hémoglobine normale:

Au cours de sa vie, l'être humain possède plusieurs types d'hémoglobines, ces hémoglobines (normales) contiennent deux chaînes α qui sont couplée à deux chaînes soit: β , δ ou γ .

- **A la naissance:** La nouveau-née synthèse en majorité l'hémoglobine fœtale « **HbF** » ($\alpha_2\gamma_2$) à 80%, ce taux diminue à deux mois pour atteindre 50%, puis il tombe à 10% à cinq mois et il continue la diminution jusqu'à qu'il arrive à moins de 2% chez l'adulte
 - **Chez l'adulte:**
 - l'hémoglobine **A1** ($\alpha_2\beta_2$) représente la principale hémoglobine avec 96à98%.
 - L'hémoglobine mineure de l'adulte **A2** ($\alpha_2\delta_2$) représente 1,5-3,4% de l'hémoglobine total.
- On trouve également **A3**, sa nature exacte n'est pas encore connue. (Fig 23) (Smaili,F.2000)

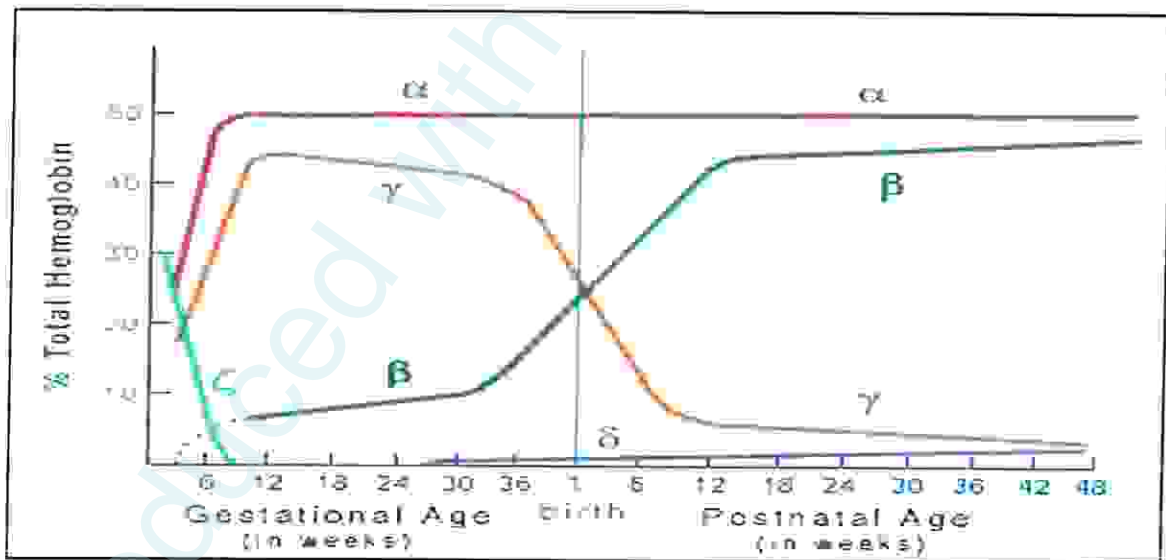


Figure 23 : évolution de la synthèse de chaîne d'hémoglobine en fonction de l'âge. [3]

II-1-2-L'hémoglobine anormale :

500 hémoglobines ont été identifiées comme anormale. Leur disfonctionnement est :

- ❖ Due à une mutation ponctuelle d'une seule base d'un gène de la structure, c'est une anomalie qualitative (cas de drépanocytose). On distingue :
 - L'HbS : retrouve dans la drépanocytose ou anémie falciforme, elle est due à une modification de structure primaire de la chaîne β avec une substitution en 6^{ème} acide aminé. L'acide glutamique est remplacé par la valine (Glu \rightarrow Val).
- ❖ Due à un trouble de synthèse de l'hémoglobine, c'est une anomalie quantitative (cas de thalassémie). On distingue :
 - L'HbC : elle est due à une mutation au niveau de la chaîne β en position 6 (Glu \rightarrow Lys)
 - L'HbE : la mutation est localisée au niveau de la chaîne β en position 26.
 - Les double hétérozygotes S/ β thalassémies : se traduit par l'association du gène drépanocytaire et d'un gène β thalassémie ; il existe 02 types.
 - β^0/S : absence de synthèse de la chaîne β .
 - β/S : diminution plus ou moins importante des chaînes β .
 - Les doubles hétérozygotes S/C : Elle est due à l'association chez le même patient de 50% d'HbS et 50% d'HbC. (Hennen, G. 1999)

II-2- Les thalassémies :

Les thalassémies sont des formes d'anémies héréditaires, associées à une hémoglobinopathie (défiance dans la synthèse d'une ou de plusieurs des quatre chaînes formant l'hémoglobine de globules rouges.) Caractérisées par la diminution ou l'absence de production des chaînes de globine α ou β normales. Cette insuffisance de synthèse d'une chaîne avec excès de l'autre type est responsable d'une anémie hémolytique, corpusculaire, microcytaire. [24]

II-2-1- classification génétique :

En fonction du gène muté et de la chaîne de globine atteinte on peut distinguer deux types de thalassémies : α et β thalassémies.

II-2-1-1- α thalassémie :

L' α thalassémie se caractérise par un déficit génétique dans la synthèse des chaînes α de la globine qui intervient dans toutes les variétés d'hémoglobine.

Dans la majorité des cas, il s'agit d'une délétion totale ou partielle d'un gène avec une absence de la synthèse de la chaîne correspondante.

Le défaut de synthèse de chaîne α peut correspondre à la délétion d'une ou plusieurs gènes α situés sur le chromosome 16. (Fig 23) (Mawell, M et All, 2004)

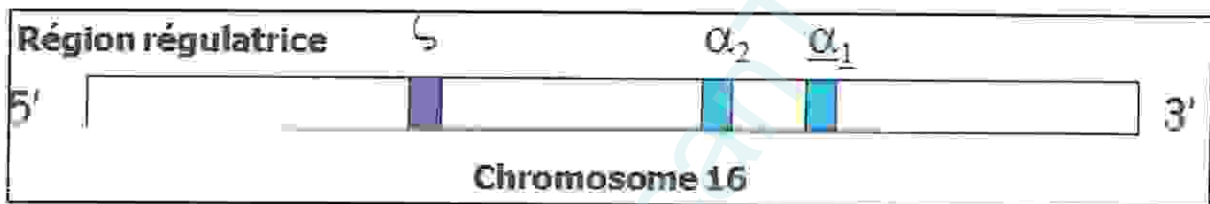


Figure 24 : l'organisation de la structure du chromosome 16. [24]

❖ **Epidémiologie :** Les α thalassémies s'observent plus fréquemment en Asie du Sud-Est et parmi les sujets originaires de la côte Ouest de L'Afrique et en Thaïlande, où sa fréquence est de 4,8 à 10%, elles sont aussi fréquentes chez les Noirs Américains. (Eberhad, P. 2002)

- Les différentes formes de α thalassémie :

Comme il existe deux gènes α par chromosome, une thalassémie peut résulter du défaut de 1 à 4 de ces gènes et par conséquent produire 04 types d' α thalassémies :

a) **La forme hétérozygote :** on distingue trois types :

- **α^+ thalassémie hétérozygote :** elle est caractérisée par une seule délétion, appelée également α thalassémie 2.
- **α^0 thalassémie hétérozygote :** elle est caractérisée par deux délétions en cis, elle se présente sous la forme d'une thalassémie mineure.
- **Association d'une α^+ thalassémie et α^0 thalassémie :** la délétion s'effectue sur 3 ou 4 gène ; résulte de la transmission d'une mutation α^0 d'un parent et α^+ de l'autre, cette forme est appelé Hémoglobinoase H.

b) La forme homozygote : il existe deux types :

- α^+ thalassémie homozygote : elle est caractérisée par deux délétions trans. Elle se présente sous la forme d'une thalassémie mineure, elle est dite : α thalassémie I.
- α^0 thalassémie homozygote : caractérisée par quatre délétions trans, celle-ci est appelée Hydrops Fotalis ou Amasarque Foetal. (Larousse médicale 2009)

II-2-1-2- β thalassémie :

Aussi appelée une maladie des globules rouges. La β thalassémie est une anémie hémolytique héréditaire, récessive, elle est caractérisée par des mutations du seul gène β « beta globine » ; porté par les deux chromosomes 11 parentaux. (Environ 200 mutation différentes du gène β globine sont responsables de thalassémies). Les lésions les plus fréquentes sont des mutations ponctuelles qui peuvent être responsable entre autre :

-D'un ARNm non fonctionnel ou absent par mutation décalant par exemple le cadre de lecture.

-D'un défaut de maturation de l'ARNm.

-Des défauts quantitatifs de transcription liés à une mutation touchant une séquence de régulation ou le promoteur.

-mutation d'un site de clivage. Ces anomalies fréquentes sont dues à une ou des substitutions des nucléotides dans l'ADN. Les enzymes responsables de la séparation des introns et des exons ne reconnaîtraient plus les sites de clivage, ce qui amènerait des erreurs dans l'ARNm.

-mutation de la polyadénylation.

Au final cela résulte en des anomalies de l'hémoglobine ou les chaîne β production insuffisante de l'hémoglobine globale. (Mawell, M et All. 2004)

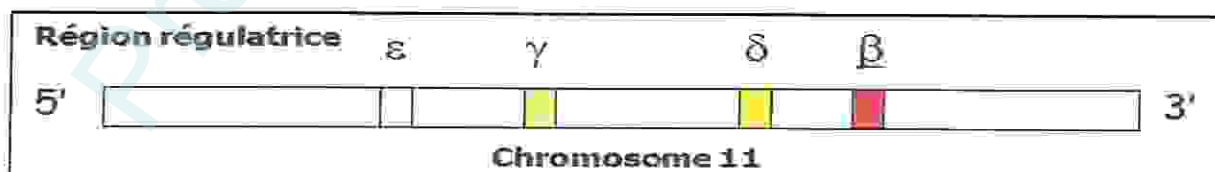


Figure 25: l'organisation de la structure du chromosome 11. [24]

- ❖ **Epidémiologie** : La β thalassémie atteint surtout les personnes originaires de partours méditerranéen (Corse, Italie, Viêt-Nam, Thaïlande). Et d'Afrique Noire. En Algérie 2% de la population sont β thalassémiques hétérozygotes. (Eberhad,P. 2002)

II-2-1-2-1- Les différentes formes de β thalassémies :

- a) **La β thalassémie hétérozygote** : c'est lorsque qu'un seule gène codant pour la chaîne β est affecté, ce qui entraîne une diminution de la quantité de l'hémoglobine à l'origine de la microcytaire et l'hypochromie :

- **β thalassémies hétérozygote mineur** : Généralement cette forme n'a pas de conséquence sur la santé, puisque l'autre gène set capable de compenser l'anomalie et de fabriquer suffisamment de chaînes β pour produire un taux d'hémoglobine normal ou proche de la normal.

L'électrophorèse de l'hémoglobine montre une augmentation du taux de l'hémoglobine A₂ de 4 à 6%.

- **β thalassémies minimales** : Cliniquement asymptomatiques. L'électrophorèse de l'hémoglobine montre un taux augmenté de l'hémoglobine A₂ sans augmentation de l'hémoglobine fœtale. (Mawell,M et All.2004)

- b) **La β thalassémie homozygote ou maladie de Cooley** : c'est la forme majeure qui survient chez un individu lorsque les deux gènes β globine sont incapables de synthétiser les chaînes β correspondantes, et la synthèse de la chaîne α est en excès; ces chaînes sont instables et précipitent dans les érythroblastes, induisant la mort des cellules. Les hématies sont hypochromes, microcytaires, anisocytaires, poikilocytaires, et l'hémoglobine fœtale comprise entre 60% et 98% avec une hémoglobine A₂ variable.

- c) **La β thalassémie intermédiaire** : c'est une anémie stable, se manifeste par l'augmentation de l'hémoglobine fœtale qui dépasse 30% et le taux d'hémoglobine reste au-dessus de 7,5g/100ml. (Harald,T. 2000)

❖ **Les doubles hétérozygotes** :

- L'association de la forme S/ β thalassémie: le sujet malade est double hétérozygote portant un gène de β thalassémie et un gène drépanocytaire. Il existe deux types :

- **β -thalasso/drépanocytose dans sa forme S/ β^0 thalassémie** : c'est la forme majeure, elle a une fréquence marquée surtout en Amérique et sur le bassin méditerranéen.

L'électrophorèse d'Hb montre 60-80% d'HbS, 10-20% d'HbF et 5-10% HbA₂.

- **β -thalasso/drépanocytose dans sa forme S/ β^+ thalassémie** : dans ce cas le taux d'HbA₁ est de 5-30% et la gravité est moindre par rapport à S/ β^0 thalassémie

L'électrophorèse montre 60-80% d'HbS, 20-30% d'HbA₁ et petite quantité d'HbA₂. En Algérie elle est plus fréquente que la drépanocytose homozygote. (Robert, Girot. 2003)

-L'association de la forme C/ β thalassémie : Il y a deux types :

- C/ β^+ thalassémie
- C/ β^0 thalassémie

L'enquête familiale montre que l'un des parents est hétérozygote pour l'HbC et l'autre est hétérozygote pour la thalassémie.

L'électrophorèse de montre que l'Hb majeure migre comme l'HbA₂ et l'HbF est légèrement augmenté 2-5%. (Smaili, F. 2000)

II-2-1-2-2- La transmission de la β thalassémie :

La transmission de la β thalassémie se fait de façon autosomique récessive, ce qui signifie que les parents ne sont pas malades, mais qu'ils sont tous les deux porteurs d'un exemplaire du gène défectueux. Seules les enfants ayant reçu le gène défectueux (muté) à la fois de leur père et de leur mère sont atteints. Ainsi, les personnes atteintes sont porteuses de gène muté en deux exemplaires alors que chacun des parents n'en est porteur qu'à un seul exemplaire. Dans ce cas, la probabilité d'avoir un enfant atteint de β thalassémie majeur est 1 sur 4 à chaque grossesse. (Fig 26) [23]

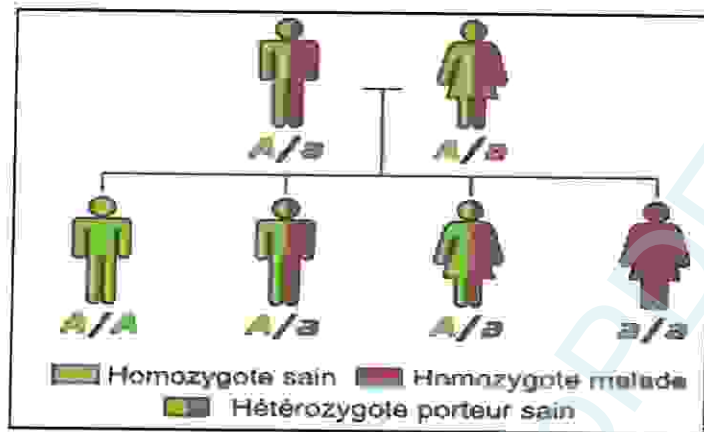


Figure 26. Illustration de la transmission autosomique récessive. [24]

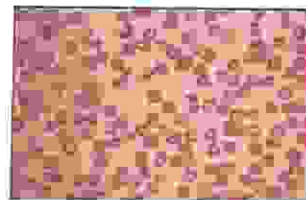
II-2-1-3-1 Les symptômes :

Une personne atteinte de β thalassémie peut soit produire des chaînes β en quantité réduite, soit n'en produire aucune, ce qui donnera des symptômes beaucoup plus sévère et précoces :

- Les β thalassémies hétérozygotes : cliniquement asymptomatiques, les sujets porteurs sont bien portants. Ils ne sont pas anémiques, exceptionnellement, une splénomégalie de petite taille peut être palpée. Peut être confondu avec un manque de fer qui entraîne également une petite taille des globules rouges, ce qui se voit lors des analyses de sang. [24]



Globules rouges normaux



globules rouges hétérozygote

-Les β thalassémies homozygotes : apparaissent dans les premiers mois de la vie, qui se traduit par une sensation de faiblesse. Le nourrisson peut sembler très fatigué, pleurer beaucoup et manger moins, s'essoufflant à la prise des biberons. Ses lèvres sa langue et les paumes de ses mains peuvent aussi sembler pales ou de couleur jaune. Une véritable jaunisse peut également apparaître : elle se voit au niveau du « blanc » des yeux qui devient jaunâtre. En cas d'anémie sévère prolongée, le volume du foie (hépatomégalie) et de la rate augmente (splénomégalie). Chez certains enfants, surtout en l'absence de traitement, des manifestations osseuses peuvent apparaître : les os de visage s'épaississent (déformation des mâchoires,

aplatissement de la racine du nez, espacement excessif des yeux).de plus, l'anémie sévère peut conduire à un retard de croissance. (Fig 27) [23]



a)Déformation des mâchoires

b) splénomégalie

c)déformation de la crâne

Figure 27 : effets de la thalassémie. [25]

-Les β thalassémies intermédiaires : les symptômes sont beaucoup moins importants que dans l'anémie majeure, elle présente 10 à 20% de la β thalassémie sévère. Les signes apparaissent plus tardivement, après l'âge de 2 ans. Les enfants atteints de cette forme atténuée de β thalassémie ont une croissance normale. Une puberté parfois retardée mais complète. L'augmentation du volume de la rate est très fréquente. (Margaret, W.2006)

II-2-1-4-Le diagnostic :

L'âge de diagnostic est variable allant de l'enfant à l'âge adulte

Le diagnostic de la β thalassémie se fait sur simple analyse de sang, lorsque le malade présente des symptômes d'anémie. L'analyse de sang permet de confirmer l'anémie et de mettre en évidence un taux anormal d'hémoglobine dite fœtale (HbF) présente en grande quantité chez les fœtus et les nouveau-nés, cette hémoglobine fœtale disparaît normalement peu à peu après la naissance. Chez les personnes atteintes de β thalassémie, l'hémoglobine fœtale (HbF) continue d'être produite pour compenser l'insuffisance d'hémoglobine normale adulte.

De plus, une autre forme d'hémoglobine, l'hémoglobine A_2 présente normalement en petite quantité (environ 2 à 3% de l'hémoglobine totale) voit également son taux augmenter.

-Dans la forme hétérozygote (mineure) : les paramètres sédimentimiques sont normaux, le dosage de l'HbA₂ a un taux supérieur à 3,4%. [23]

-Dans la forme intermédiaire il y a la microcytose et l'hypochromie, c'est une anémie régénérative. L'électrophorèse de l'Hb suffit rarement pour un diagnostic génotypique précis, celui repose sur l'enquête familiale.

-Dans la forme homozygote : $Hb \leq 7g/l$. L'examen du frottis sanguin des hématies montre : une hyperchromie, une anisocytose, une poikilocytose et une érythrablastose parfois très élevés, jusqu'à 100 000 éléments par mm^3 ; la moelle est très riche en érytoplastes.

L'électrophorèse de l'Hb permet de diagnostic de la β thalassémie ; le pourcentage d'HbF est augmenté (30- 95%) et il persiste (β^+ -Thalassémie) ou pas (β^0 -Thalassémie) de l'HbA, avec pourcentage de l'HbA₂ normal ou parfois élevé. [24]

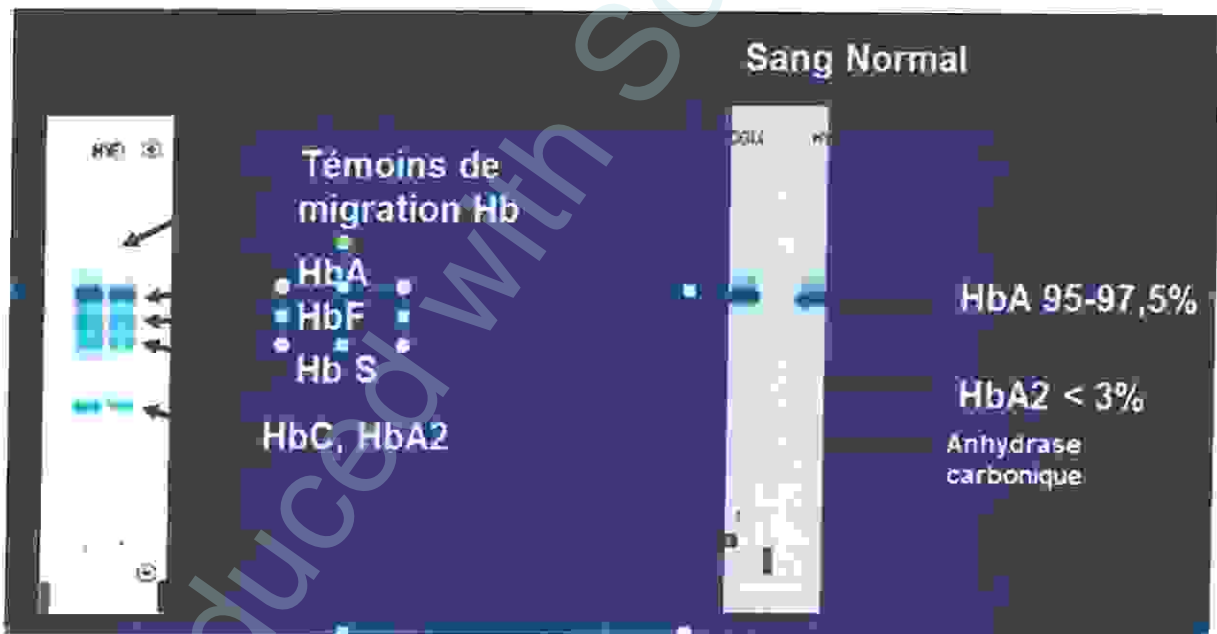
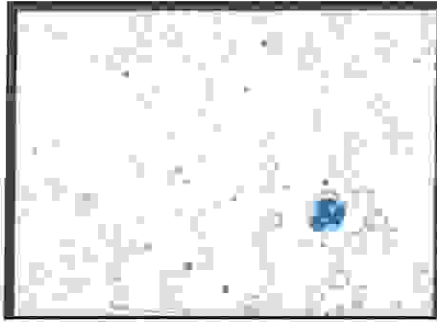


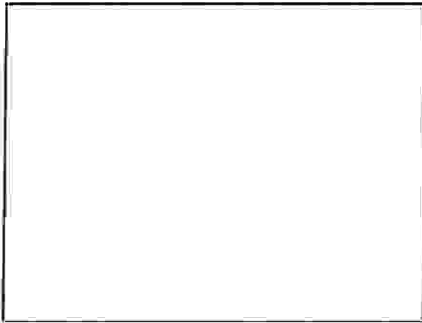
Figure 28 : une électrophorèse de Hb à pH alcalin. [25]



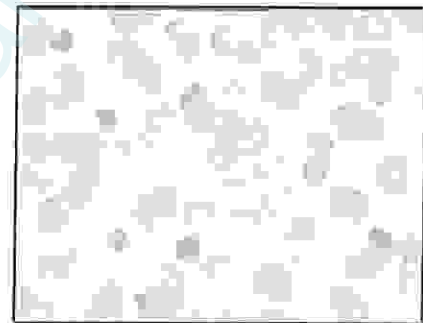
Hypochromie



Anisocytose



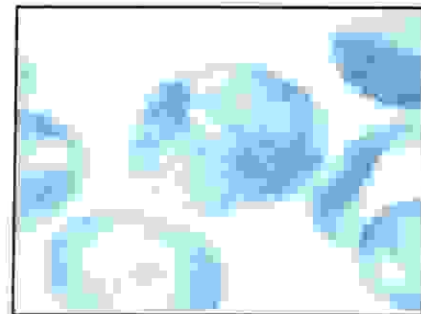
Macrocytose



Poikilocytose.



Microcytose



Réticulocyte

Figure 29: les différentes anomalies qui peuvent toucher les globules rouges. [27]

-Le diagnostique prénatal :

Il est proposé aux couples à risque (β -Thalassémie hétérozygote) et en particulière ceux dont les enfants pourraient avoir des sévère thalassémie. Ce diagnostic permet de déterminer le type d'affection dont l'enfant sera porteur, et de faire clairement comprendre aux parents dès lors d'organiser leur planning familial en toute connaissance de cause. Il se fait entre 8^{em} semaine et la 10^{eme} de grossesse. La biopsie de trophoblastes et la recherche des défauts moléculaires peuvent permettre de faire diagnostic d'homozygotes β -thalassémique chez l'embryon. La conséquence en est l'indication de l'interruption de la grossesse. (Pirre,L et All.2000)

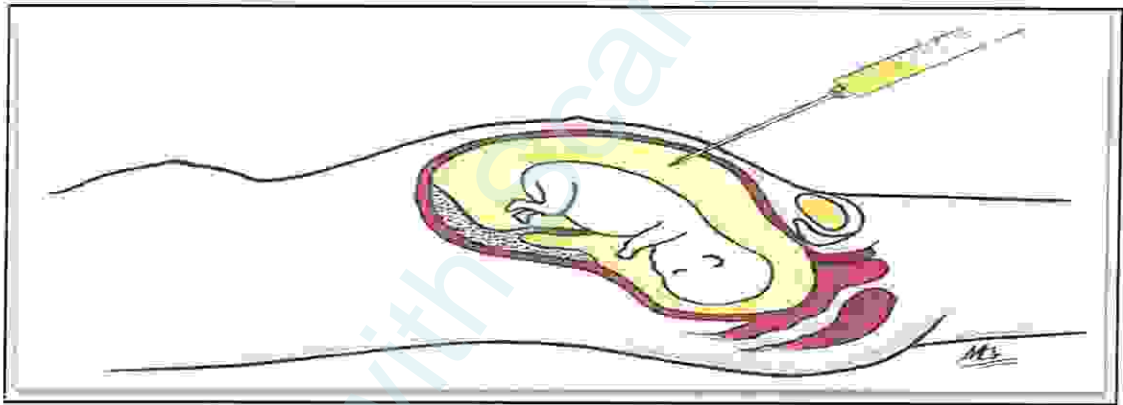


Figure 30 : L'amniocentèse. [28]

II-2-1-2-5- Le traitement :

II-2-1-5-1-La transfusion sanguine :

Les personnes atteintes d'anémie majeure (Cooley) ne fabriquent pas assez d'hémoglobine pour vivre et des transfusions sanguines régulières leur sont indispensables. Elles sont effectuées environ tous les mois.

La transfusion consiste à injecter au malade du sang ou des globules rouges prélevés sur un donneur pour maintenir un niveau acceptable de globules rouges dans le sang. Une nouvelle transfusion est effectuée lorsque les globules rouges transfusés précédemment ont été détruits. Un taux d'hémoglobine correct est ainsi maintenu en permanence la fréquence de transfusion augmente avec l'âge : en moyenne 255-500 cc de culot érythrocytaire toutes les 3-5 semaines à vie. La plus part du temps, les enfants et les adultes atteintes de β -thalassémie intermédiaire supportent bien l'anémie, il se fatigue plus vite que les autres mais n'ont généralement pas besoin de traitement particulier. Cependant, il arrive que l'anémie s'aggrave, en raison par exemple d'une infection ou d'une grossesse ; des transfusions occasionnelles seront donc nécessaires. [24]

II-2-1-5-2-Splénectomie :

Dans certains cas, il est recommandé de retirer la rate par chirurgie, afin d'éliminer le siège de destruction des globules rouges. Cette opération est appelée splénectomie, elle est conseillée lorsque les besoins de transfusions sont trop élevée chez les personnes atteintes de thalassémie majeure et pour diminuer l'anémie quand elle est mal tolérée chez celles atteinte de thalassémie intermédiaire. Lorsque, il n'y a plus de rate, l'anomalie de l'hémoglobine persiste, mais les globules rouges ne sont pas plus détruits de manière excessive et ils peuvent exercer tant bien que mal leur fonction de transporteur d'oxygène. (Smaili, F.2000)

II-2-1-5-3-Le traitement de la surcharge en fer :

La surcharge est plus précoce et plus sévère dans la thalassémie majeure ou elle est principalement due aux transfusions régulières. Le fer en excès dans le sang s'accumule dans différents organes du corps, devient toxique, perturbant le fonctionnement normal (atteinte cardiaque, fibrose ...) les atteintes hormonales sont les plus fréquentes (hormone sexuelles, diabète, hyperthyroïdie). Afin d'éviter au maximum cette surcharge en fer, les personnes

transfusées doivent régulièrement suivre un traitement par un chélateur du fer. Ce dernier agit un peu comme un aimant en attirant le fer, créant une sorte d'amas qui est facilement éliminé dans l'urine ou les selles. Trois médicaments existent à présent, le premier chélateur de fer qui a été disponible était la Desferrioxamine. Elle a beaucoup amélioré l'espérance de vie des personnes thalassémiques ; elle est administrée par voie sous-cutanée. Un autre chélateur de fer qui lui se prend par voie orale, est la Défériprone. Elle semble très active pour protéger le cœur.

La Défériprone peut parfois être associée à la Desferrioxamine si la surcharge en fer est trop importante.

Le troisième chélateur, le Déférasirox a récemment montré son efficacité par voie orale pour éliminer le fer en excès

Le chélateur du fer est débuté en règle après 50 transfusions, soit 2-3 ans après la prise en charge correcte. (Margaret, W.2006)

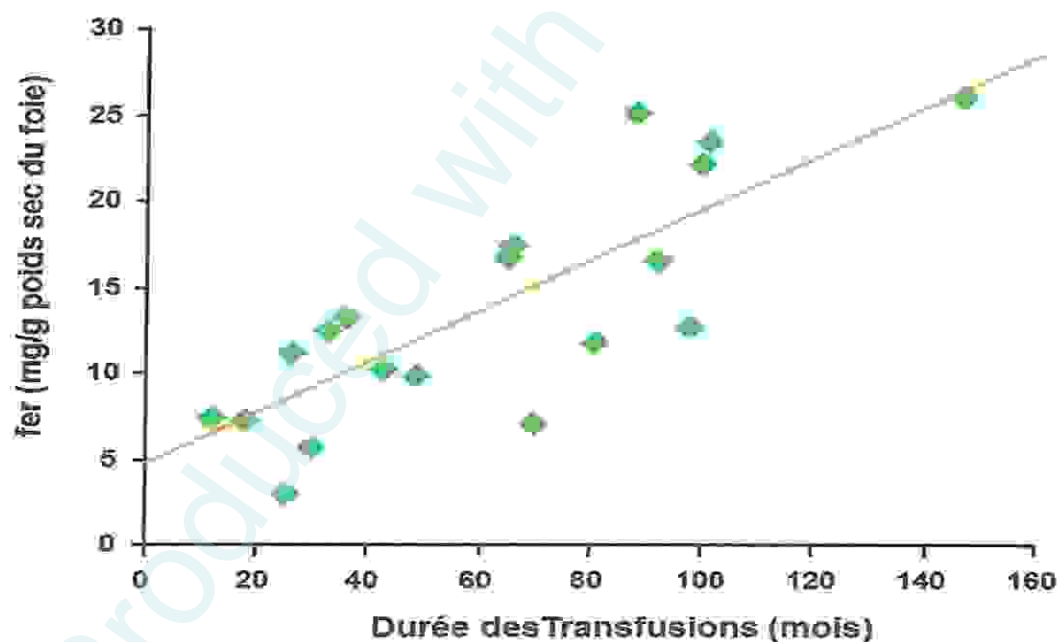


Figure 32: Relation entre transfusions et surcharge en Fer. [30]

II-2-1-5-4-La greffe de moelle osseuse :

Le seul traitement qui puisse guérir définitivement la maladie est la greffe de moelle osseuse, appelée également « greffe de cellules souches hématopoïétiques » : ces cellules souches, une fois greffées chez le patient, vont être capables de fabriquer, entre autre, des globules rouges sans anomalie. Cette procédure est réservée aux malades présentant une thalassémie majeure et disposant dans leur famille d'un donneur compatible qu'il soit sain ou porteur d'une thalassémie mineure. (Margaret, W.2006).

II-2-1-5-5-Autre traitement chez l'adulte :

A l'âge adulte, d'autres traitements peuvent être nécessaires : traitement des insuffisances hormonales, traitement de l'ostéoporose, traitement des ulcères de jambe et des phlébites (formation d'un caillot de sang dans une veine) qui se produisent plus fréquemment chez les personnes thalassémiques. Certains malades ont également pu contracter une hépatite virale et nécessiter un traitement spécifique. (Smaili, F 2000)

Chapitre III

L'apport de la thérapie génique dans le traitement de β -thalassémie

Produced by Scantopdf

Ce projet nous a permis d'approfondir nos connaissances sur la thérapie génique et le rôle qu'a joué cette dernière dans le traitement de la β -thalassémie.

La thérapie génique pourrait concerner 80% des sujets thalassémiques n'ayant pas accès à une greffe de la moelle osseuse. Après autorisation des autorités sanitaires françaises (AFSSAPS, 2006), une équipe scientifique sous la direction du Pr Philippe Leboulch (responsable scientifique de l'essai clinique et chef de l'institut des maladies émergentes et des thérapies innovantes (INSERM, université Paris-sud) au département de biothérapie de l'hôpital Necker-enfants malades « (INSERM, paris) »). (Christophe, Iainne, 2010) a lancé l'essai thérapeutique (thérapie génique) sur un sujet atteint de β -thalassémie (β^E/β^0). Ce patient âgé de 18ans (Paul Louis), d'origine Thaïlandaise et Vietnamiennne, était dépendant depuis son enfance de transfusion mensuelle. [3]

III-1-Le Protocole expérimental de la thérapie génique traitant beta thalassémie :

Le protocole expérimental consistait à prélever les propres cellules de moelle osseuse du patient (cellules donnant naissance aux cellules sanguines et notamment aux globules rouges). Ces dernières ont été mises en culture avec un vecteur de type Lentivirus (ressemblant au virus du Sida) contenant le gène thérapeutique de la β globine. L'infection des cellules par ce vecteur a pour but l'insertion du génome viral et du gène sain dans le génome de la cellule cible (méthode en *ex vivo*).

Par la suite le patient a été soumis à une forte chimiothérapie, afin de détruire la plupart des cellules souches hématopoïétiques demeurant dans sa moelle osseuse malade. 48 heures plus tard, les cellules souches génétiquement modifiées ont été réintroduites au patient par voie intraveineuse. Le jeune homme est resté 01mois à l'hôpital, le temps de surveiller sa moelle osseuse, et de constater l'effet du gène médicament introduit. [25]

II-2-Résultats:

L'effet de la thérapie génique n'a pas été immédiat, mais a été constaté après plusieurs mois :

30 mois après l'expérimentation, plus de 10% des cellules souches de la moelle contenaient le gène correcteur, dont 03% des érythroblastes (la lignée cellulaire donnant naissance aux globules rouges). La concentration globale d'hémoglobine avait atteint 9g/dl, la valeur que permettent d'obtenir les transfusions sanguines. (Christophe, lalanne.2010)

Le patient n'ait eu besoin d'aucune transfusion depuis plus de deux ans. Il était arrivé même à faire des saignées régulières pour accélérer l'élimination du fer toxique, qui s'était accumulé depuis des années à cause des transfusions qu'il faisait. La vie de ce patient avait changé depuis. (Fischer, Alain. 2010)

Dans le suivi post-thérapie génique : un séquençage de l'ADN (pour s'assurer de l'absence de risque lié à l'insertion du gène du vecteur sur l'ADN du patient) avait montré que dans la moitié des cellules modifiées génétiquement, le gène viral s'est inséré dans le gène qui code pour la protéine « HMG₂ », connue pour participer à la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules de la moelle osseuse. 16 mois après la greffe, l'expression de ce gène, normalement nulle, avait augmenté de 10 000 fois. Cette insertion a sans doute favorisé l'efficacité de la thérapie, en augmentant la multiplication des érythroblastes.

La protéine HMG₂ produite en grande proportion (quantité anormale) aurait pu provoquer une prolifération anormale et continue des cellules sanguines (Leucémie) mais après une année de suivi, les chercheurs ont constaté que le nombre de ces cellules était stable ce qui est rassurant. Pour l'heure, il reste impossible d'établir un pronostic sur l'effet à long terme du gène viral sur la prolifération cellulaire.

Devant les excellents résultats, l'Afssaps a autorisé le traitement d'un deuxième patient. Comme la précédente afin de vérifier si ces résultats positifs peuvent être reproduits. (Fischer, Alain. 2010)

Conclusion et Perspectives :

Des efforts notables ont été réalisés depuis une dizaine d'années, tout particulièrement en France, aux États-Unis et au Royaume Uni, afin de rendre possible l'application de la thérapie génique en clinique humaine. Un examen objectif de ce qui a été déjà atteint, permet d'être raisonnablement optimiste pour l'avenir. En effet, la preuve a été apportée que la thérapie génique représentait une méthode prometteuse dans le traitement de la β -thalassémie (16). Les résultats obtenus après l'introduction du gène médicament dans les cellules souches de la moelle osseuse du patient, montrent une augmentation significative du taux d'hémoglobine (9g/dl), cela confirme que le gène modifié de la β globine a intégré et est exprimé spécifiquement dans les globules rouges différenciés. L'efficacité de cette technique est en générale satisfaisante dans la mesure où le nombre de ces cellules transformées a été également augmenté et est resté stable pendant une année.

Afin de vérifier ces résultats positifs :

- Les chercheurs devraient refaire la même intervention thérapeutique pour une plus large série de patients en prenant en compte le problème d'éthique ; En effet, Certaines critiques avancent qu'on ne devrait pas toucher aux gènes humains de quelque façon que ce soit et que cela mènera inévitablement à l'eugénisme et la modification de la constitution génétique des populations humaines. Il faut également savoir que les essais de thérapie génique doivent se conformer aux règles générales des essais thérapeutiques, et en particulier à la loi du 20 Décembre 1988 sur la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales. Les protocoles de ces essais doivent être soumis aux comités consultatifs de protection des personnes (CCPPRB) institués par cette loi. Pour soulever ce problème d'éthique, il serait intéressant aux scientifiques de chercher des modèles animaux dont la constitution physiologique est proche de celle de l'être humain.
- Il faudrait également vérifier l'effet à long terme du gène viral sur la prolifération des globules rouges (Leucémie) des patients soumis à cette thérapeutique.

Donc, réussir techniquement à introduire un gène sain, n'est cependant pas suffisant, il faut être certain que celui-ci ne perturbera pas l'expression d'autres gènes importants, qu'il n'est pas toxique pour la cellule et que la quantité de protéines produites ne sera ni trop faible ni excessive. En outre, le vecteur utilisé doit être capable de transporter le gène thérapeutique au bon endroit, avec efficacité et en toute sécurité. (7)

A l'heure actuelle, les techniques de thérapie génique sont extrêmement coûteuses, et nécessitent la présence d'experts et de matériel que l'on ne trouve que dans les grands centres médicaux. Cette thérapie ne pourra donc concerner qu'une certaine classe de la société et ne pourra être proposée comme option thérapeutique pour la β thalassémie qu'après évaluation des bénéfices et des effets secondaires dans une plus large série de patients. (12)

L'avenir de cette technique dépend donc de la poursuite des essais cliniques avec le respect scrupuleux des règles éthiques. (7)

Produced with ScanTopdf

المُلخَص:

الهندسة الوراثية هي مجموعة من العمليات القائمة على معرفة بنية الجينات وإمكانية عزلها والقدرة على تغييرها واستعمالها في معالجة الأمراض، وذلك يقتضي استبدال الجينات المصابة بجينات سليمة وهو ما يعرف بالعلاج الجيني.

العلاج الجيني أو نقل الجينات لغرض علاجي هو عملية تقوم على إدخال المادة الوراثية سليمة إلى الخلية المصابة لإصلاح خلل معين.

العلاج الجيني في توسع مستمر لينتقل حاليا إلى معالجة أمراض β تالاسيميا.

النجاح العظيم الذي حققه الباحثون في هذا المجال تجسد في معالجة شخص مصاب بـ β تالاسيميا، وقد تم شفاؤه باستعمال هذه التقنية.

الكلمات المفتاح:

المعالجة الجينية، الجينات المعالجة، الناقل، الخلايا الأصلية، فيروس، β تالاسيميا، β غلوبين.

Produced with Scantopdf

Résumé :

Le génie génétique est un ensemble d'opération qui comprend principalement la connaissance de la structure des gènes, la possibilité de les isoler, la capacité de les modifier et pourquoi pas les utiliser.

La thérapie génique est conceptuellement très simple: il s'agit d'introduire du matériel génétique dans des cellules cibles pour corriger une pathologie donnée.

Le champ d'action de la thérapie génique ne cesse de s'étendre et vise aujourd'hui des maladies telles que la beta thalassémie.

Celle-ci est une des maladies génétiques les plus courantes au monde. Elle est due à la mutation du gène codant pour la chaîne β de l'hémoglobine.

Une belle victoire vient en tout cas d'être annoncée par des scientifiques; un jeune adulte atteint de beta thalassémie, a été guéri grâce à cette thérapie.

Mots clés : thérapie génique, gène thérapeutique, vecteur, cellule souche, virus, β thalassémie, β globine.

Abstract :

Genetic engineering is a set of operation which includes mainly the knowledge of gene structure, the possibility of isolating them, the ability to change and why not use them

Gene therapy is conceptually very simple: it is the introducing of the genetic material into a target cell to correct a given disease.

The scope of gene therapy is very large and continues to expand and aims diseases such as beta thalassemia

The last one is one of the most common genetic diseases in the world. It is due to mutation of the gene encoding the β chain of hemoglobin.

A great victory has been announced by scientists: a young adult patients with β thalassémia, was cured with this therapy.

Keywords: gene therapy, gene therapy vector, stem cell, virus, β thalassémia, β globin.