## Génétique et thérapeutique



Sans notre avis, comme d'habitude!!









Réponses de l'organisme, des génomes, et de leurs expressions à la Sélection.

#### L'ADN DANS LA CELLULE

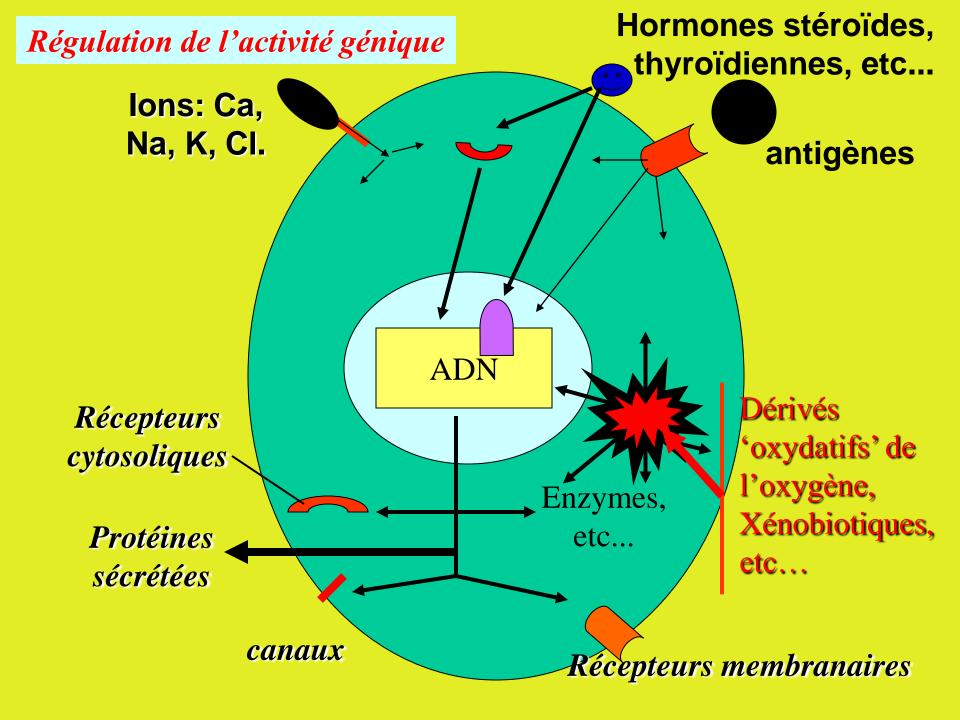
NOYAU: ADN nucléaire



CYTOPLASME: ARN's messagers, ARN ribosomaux, ARN de transfert.

Lieu de la synthèse des protéines de nature enzymatique

ou de nature " fibreuse ".





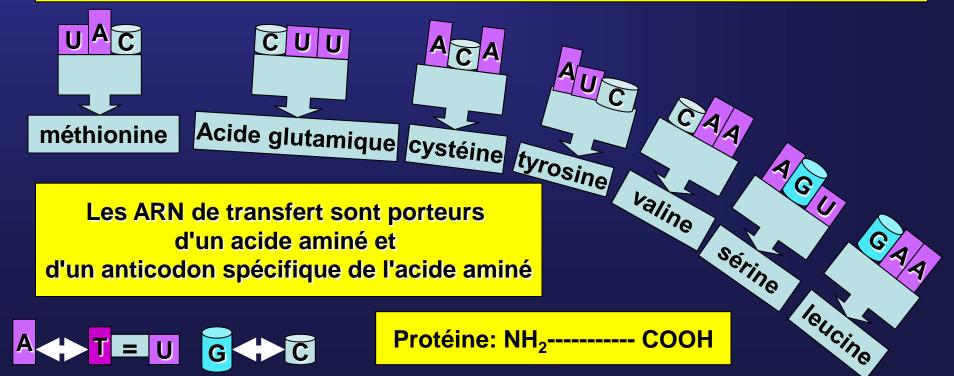
# Séquence génique d'ADN transcription complémentarité des bases ARN messager complémentaire traduction code génétique polypeptides spécifiques enzymes environnement non enzymes PHENOTYPE Observé

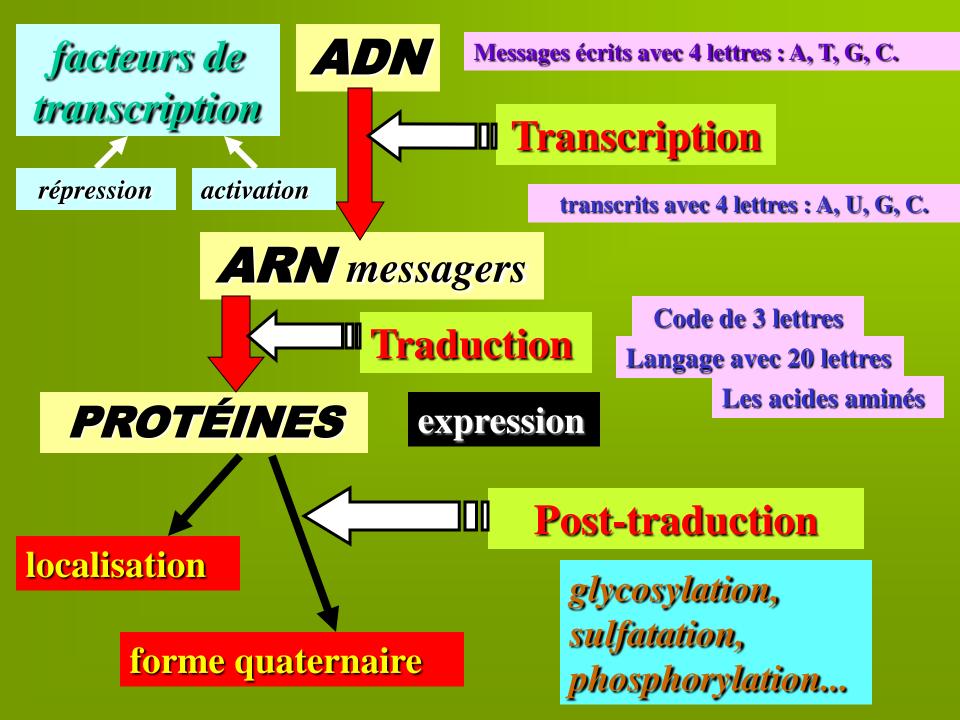


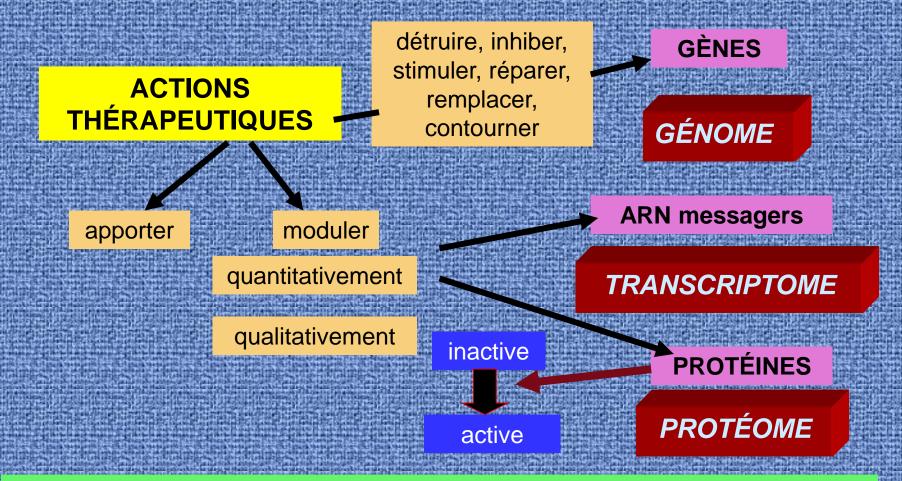
La lecture pour la transcription en ARN messager se fait dans le sens 3'- 5'



La lecture pour la traduction des codons en acides aminés se fait dans le sens 5'- 3'



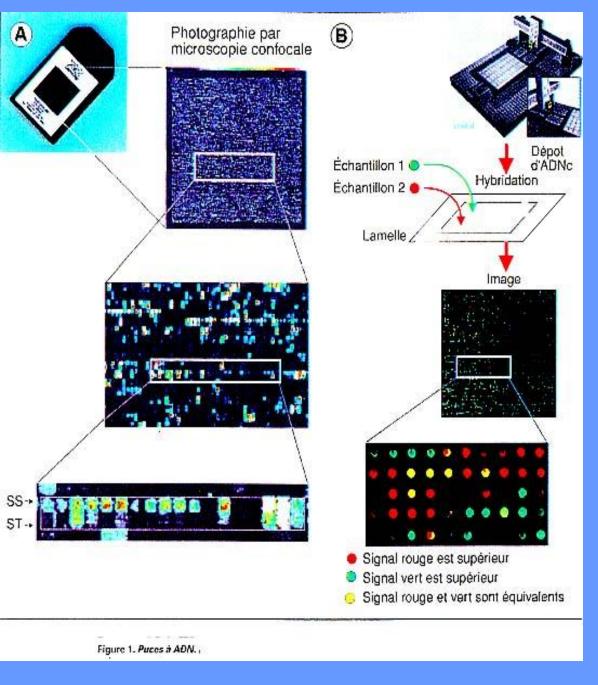




Protéines ayant activité d'enzymes : anabolisme, catabolisme Protéines de structure (collagène, myosine..)

Protéines de signal et de régulation (intercellulaires: cytokines, hormones - intracellulaires – membranaires: les récepteurs)

Protéines de transport (extracellulaires, intracellulaires, membranaires: canaux ioniques)
Protéines de protection (Ig)
Protéines du soi (système HLA)



## A: puce à ADN Affymetrix

60 000 à 400 000 oligonucléotides

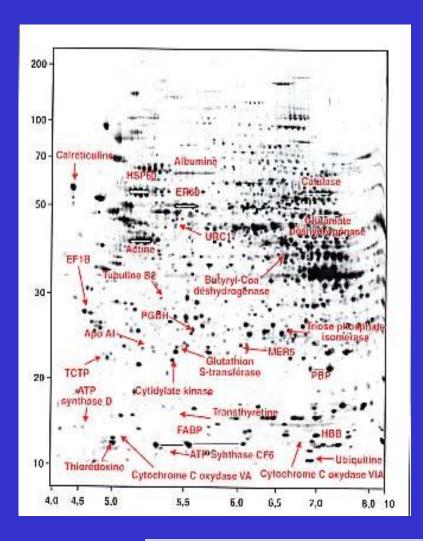
SS = sonde spécifique ST = sonde témoin

Concentration mesurée par la moyenne des différences.

# B: puce à ADN préparée en parallèle:

Micropipetteur robotisé qui dépose des ADNc sur la surface de la puce.Échantillons 1 et 2 d'ARNm de deux tissus différents marqués par des fluorophores différents.

## **PROTEOME**



1/ Isolement et séparation en 2 D de toutes les protéines de l'échantillon biologique.

(gel acrylamide)

2/ Identification et caractérisation des protéines par spectrométrie de masse.

3/ Analyse quantitative et séquençage du peptide.

le nombre des gènes humains est grand mais n'est pas infini

le nombre des gènes allèles pour un gène est plus ou moins grand mais pas infini

par exemple le gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) en 7q31, avec 27 exons, 250 000 paires de bases, 1 480 acides aminés, plus de 1 000 variants:

près de 500 variants délétères en France sont responsables de différentes formes phénotypiques c'est-à-dire cliniques de mucoviscidose

par contre le nombre des combinaisons géniques est infini

mais les SÉLECTIONS : naturelle, etc....

ne retiennent que les plus APTES

## XÉNOBIOTIQUE = MÉDICAMENT = substance étrangère à l'organisme

Son élimination

Son administration

voies digestive, aérienne, IM, IV, percutanée, per mucosae...

Son absorption

Son **stockage** 

Sa **réabsorption** 

Voies digestive, urinaire, aérienne, cutanée, etc...

Son transport

voies sanguine, lymphatique, intercellulaire

Son **métabolisme** 

Les passages (hépatique.....) et leurs conséquences

Ses actions

Ses transformations = ses métabolites

actifs, inactifs, antigéniques, toxiques, génotoxiques, etc...

actions des métabolites: sur la cible

sur d'autres cibles

Part du génome dans la variabilité de la cinétique et de la dynamique d'un médicament, d'un xénobiotique?

### **ALCOOL ÉTHYLIQUE**

N'existe pas normalement dans notre organisme

La Drosophile ou Mouche à vinaigre n'est jamais saoule et pourtant elle boit beaucoup d'alcool éthylique !!!!!

lipophile hydrophile

CH<sub>3</sub> – CH<sub>2</sub> OH ethanol

CH₃ – CHOH acétaldéhyde [ CH<sub>3</sub> – CO ~ Coenzyme A acétylcoenzyme A

cycle de Krebs acides gras stéroïdes acide lactique..

ADH alcool - déshydrogénase

ALDH aldéhyde – déshydrogénase mitochondriale

>ADH: gène non modulable, actif dans le foie (1,6gr/kg/24h), la muqueuse gastrique

Drosophile: ADH = 1/100 de son poids 2 allèles: 1et 2 mouches 11/12/22 12 ont une activité enzymatique la plus intense

Système microsomial (MEOS) hépatique inductible:

monooxygénase à cytochrome P450 gène CYP2A1

acétaldéhyde disponible pour se combiner avec protéines, ac.nucléiques, etc...

éthanol et les membranes neurales du système nerveux central

Disulfirame (ESPERAL..) inhibiteur de l'acétaldéhyde déshydrogénase

Même maladie, malades *différents*, même thérapeutique?

Même maladie, *même malade selon âge*, même thérapeutique?

Maladies différentes, malades différents, même thérapeutique?

Les variations de l'action d'une même thérapeutique

Maladie Malade Thérapeutique L'âge du patient, le sexe, son environnement, etc...

Le facteur de la maladie

Dans le temps

Selon les malades

Thérapeutique adaptée

Cas des médicaments !!!

## **GÈNES ET MÉDICAMENTS**

**PHARMACOCINÉTIQUE** 

mouvements

Absorption, fixation, transformation, élimination

**PHARMACODYNAMIQUE** 



actions

**PHARMACOGÉNÉTIQUE** 

**PHARMACOGÉNOMIQUE** 



gène responsable de la cinétique, de la dynamique d'un médicament

**GÈNE** 

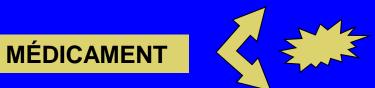




**MÉDICAMENT** 



médicament capable de modifier l'expression, voire la structure d'un gène





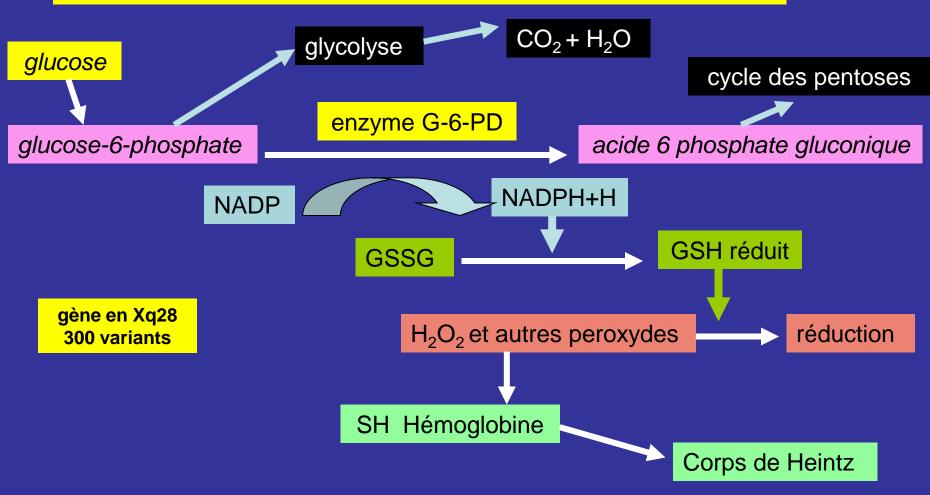
**NÉOGÈNE** 



génomes et interactions médicamenteuses

## Le paradigme en pharmacogénétique l'enzyme érythrocytaire Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase et la Primaquine

1941: 1/20 GI noirs + primaquine = hémolyse des globules rouges



Phénacétine, sulfonamides, bleu de méthylène, etc...et fèves crues.

Le paradigme: l'oligophrénie phénylpyruvique ou phénylcétonurie

La phénylalanine = xénobiotique et sa métabolisation la rend toxique

phénylalanine tyrosine

Hyperphénylalaninémie résulte d'un déficit d'une enzyme hépatique: la phénylalanine hydroxylase

Acide phényl-pyruvique, etc...

hydroxylation

Mutations du gène situé en 12q24.1

- > exon 3: 111 Arg / C »T = codon de terminaison
- > exon 7: 280 Glu / Lys
- > exon12: 408 Arg / Trp
- > intron 12:C » T = arrêt de l'épissage
- > etc...

La plupart des patients sont des hétérozygotes avec 2 allèles différents

Traitement: régime dépourvu de phénylalanine

Résultat: non apparition des manifestations du déficit enzymatique

Population	Incidence (q²)	fréquence génique (q)	Fréquence des hétérozygotes (2pq)
Écosse	1 / 5 300	0,014	1/30
Finlande, Japon	1 / 200 000	0,002	1 / 250
France	1 / 10 000 à 15 000	0,01 à 0,008	1 / 50

## Les enzymes et les gènes du métabolisme des xénobiotiques

>Phase I: fonctionnalisation

hydroxylases=monooxydases: les cytochromes P450 ont aussi la possibilité de désamination, désulfuration, déshalogénisation, etc...

hydrolases: exe: les estérases

inductibilité des gènes et ses conséquences

CYP3A4: statines – jus de pamplemousse inhibe

CYP2E1: composés aromatiques de la cigarette – éthanol stimule

➤ Phase II: conjugaison: transférases: acide glucuronique, SO₄, glutathion, méthyl, acétyl.

neutralise - hydrophilise

Isoniazide: acétyleur lent, rapide.

**▶**Phase III: élimination cellulaire

MDR (Multi Drug Resistant: la glycoprotéine P et le gène mdr1

les 6 isoformes MRP (multidrug related protein): transport transmembranaire

MRL (lung)

➤ Phase IV: réabsorption

**Insecticides**: parathion, malathion, fenthion, etc...

#### Anti-ChE médicaux :

Mytélase (ambénomium), Mestinon (pyridostigmine), Prostigmine (myasthénie), Phospholine (collyre-glaucome),

Cognex (tacrine), Aricept (chlorhydrate de donepezil), Exelon (rivastigmine) (m.Alzheimer)

Les symptômes de l'intoxication sont fonction du mode de contamination, de sa durée, de la dose, du composé, etc.. (exe: si oculaire / myosis) et des capacités de détoxication

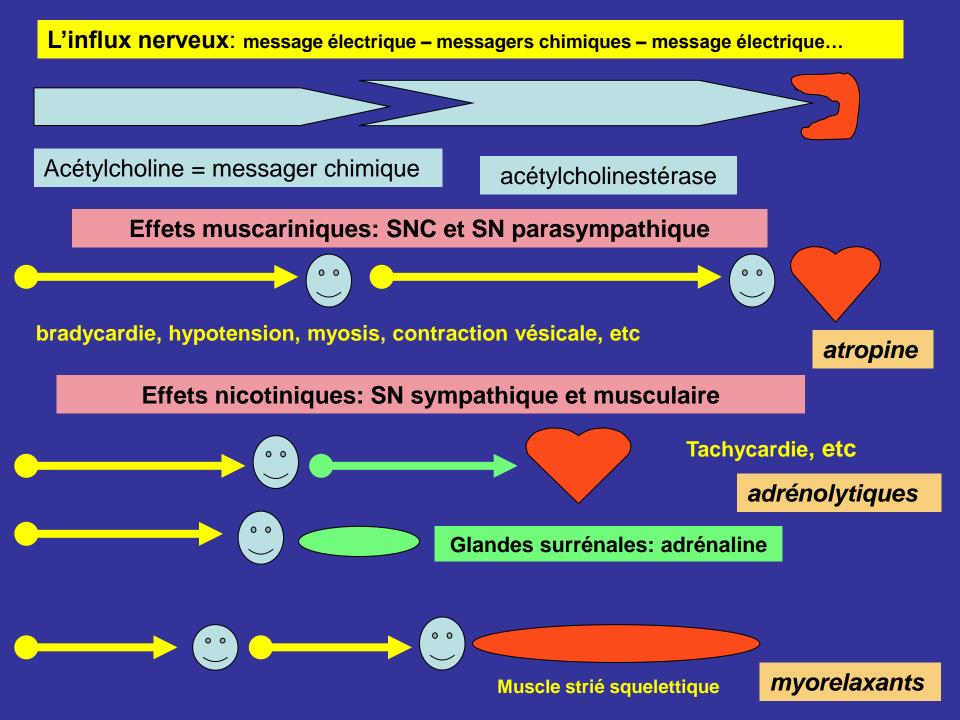
Intoxication aiguë

sarin – tabun – soman – VX : pupille étroite (perte de vision), hypersalivation, contractions musculaires, défécation, perte de connaissance, etc..



Intoxication chronique par les insecticides

Douleurs abdominales, rhinorrhée, mal de tête, somnolence, fatigue, paresthésie, etc...



#### **PARATHION: insecticide**

Cytochrome P450 hépatique, etc

gène CYP3A4 et ses allèles: 7q21.1

activation: oxygène remplace soufre

#### **PARAOXON:**

antiacétylcholinestérasique

inactivation (hydrolyse) par la paraoxonase sérique

Génotypes: L55/L55, L55/M55, M55/M55, L55/L90, L90/D124, etc...

acétylcholine acétylcholinestérase

Gène AChase: 7g 22.1 et ses allèles

activateur: Contrathion (pralidoxime)

inactivation par hydrolyse

Gène PON 1 et ses allèles: 7q 21.3

Leucine-L 55 M-méthionine proline-P 90 L-leucine acide aspartique-D 124 missplice glutamine-Q 192 R-arginine Q - R tryptophane-194 stop etc...

Phénotypes: activité de la paraoxonase sérique selon le génotype et le substrat

R/R (+) Q/Q (-): inactivation du paraoxon

R/R (-) Q/Q (+): inactivation du sarin

#### Les arylamine N-acétyltransférases: NAT1 et NAT2

**Substrats:** les arylamines et les hydrazines: isoniazide, hydralazine, sulfamides, fumée de cigarettes, viandes au barbecue, polluants...

Gènes: NAT1 (ubiquitaire); NAT2 (foie, intestin) en 8q21.3 - 23.1

NAT1: variants alléliques dans la zone codante et non codante: m RNA instable

NAT2: variants alléliques (20) acétyleurs lents: enzymes instables, m ARN moins traduit

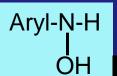
les plus fréquents: Arg 64 Gln lle 114 Thr Arg 194 Gln Gly 286 Glu

Phénotypes NAT2: test non invasif des métabolites urinaires de la caféine

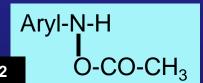
acétyleurs lents: génotypes NAT2(-) / NAT2(-)

Aryl-NH<sub>2</sub>

CYP1A1







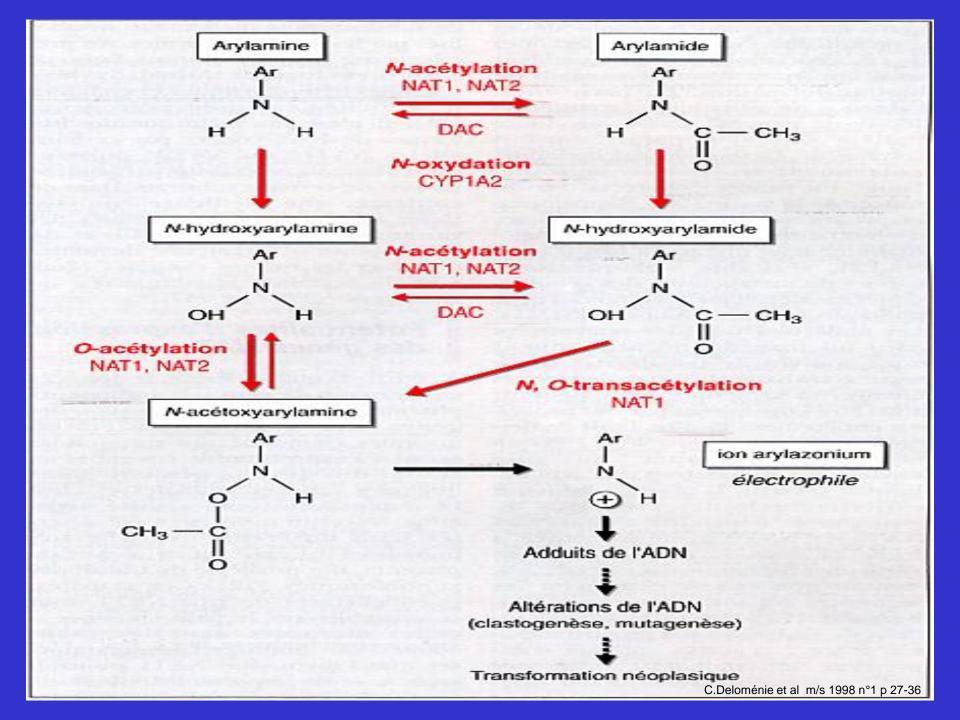
Aryl-NH(+)

Adduit puis altération de l'ADN

N-acétoxyarylamine instable

Il faut que les monoacétyles cytotoxiques soient rapidement diacétylés

Susceptibilité: vessie, colon-rectum, mésothélium si déficit en glutathion S transférase



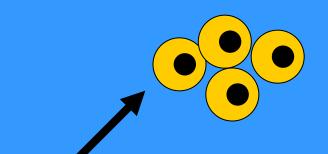
## Tous les matins le roi Mithridate VI prenait son poison



## Clone initial uni génomique



# Population multi génomique

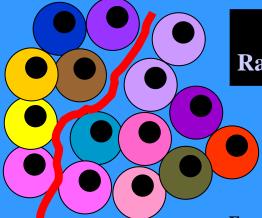


Cellule cancéreuse

Mutation génique ou chromosomique



Cellule normale ou prédisposée



Stress de la Radio Chimiothérapie

**SÉLECTION** 



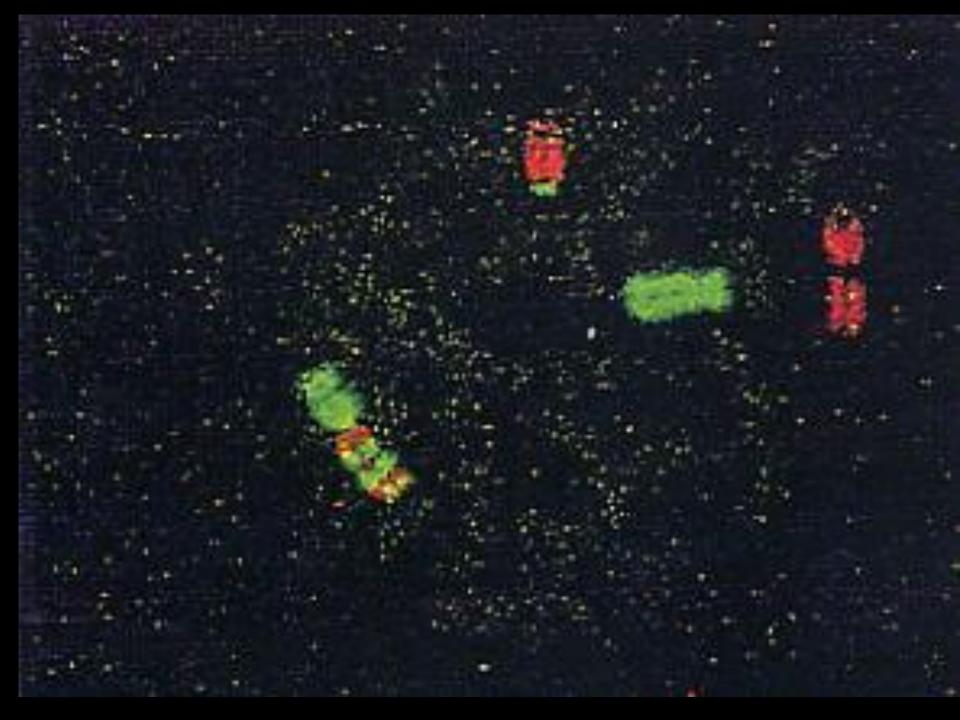
Exe: mutation d'un gène cible (DHFR); amplification d'un gène préexistant (DHFR-MDR1-Enzyme de réparation de l'ADN); Variation des antigènes de surface; etc..

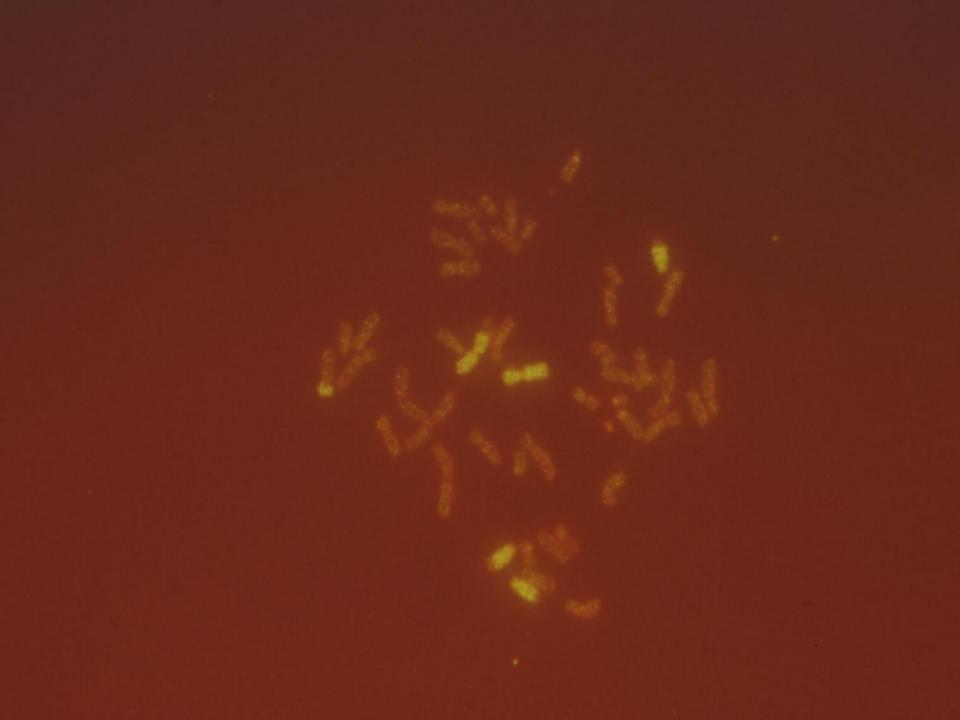
Clone uni génomique



Nouvelle population







#### La chimiorésistance spécifique ou généralisée et les cancers

Les substances: les antimétabolites, les alkylants, les antibiomitotiques, les antifusoriaux, etc

Les cibles: exe: K chimiosensibles, K chimiosensibles puis résistants, K résistants

Mécanismes de la chimiorésistance cellulaire

avant la cible: absorption, inactivation par les enzymes des phase I et II, etc...

au niveau de la cible

à l'entrée

Le passage de la membrane plasmique

à l'intérieur

capacités de fonctionnement et de réparation augmentées: du DNA, activation des gènes du stress (les HSP), protéasomes, etc...

mutations de la cible: enzymes mutées, blocage de l'apoptose, etc...

séquestration dans la cible: surexpression du gène LRP

élimination intensifiée

Les systèmes pompes

MDR 1 et MRP 1-6

## MDR 1 (multidrug resistance)

Le gène en 7q21.1

Glycoprotéine P-170: P-gp (P=perméabilité)

m RNA: 4 h de1/2 vie

protéine transmembranaire: 16 h

source d'énergie: l'ATP

substrats variés: substances naturelles, synthétiques lipophiles

chimiorésistance spontanée ou acquise

Altération par mutation

Surexpression du gène

Inhibition de la P-gp

Vérapamil (Isoptine)(inhibiteur des canaux calciques), cyclosporine

Anticorps monoclonal

Glycoprotéine à

longue

durée de vie plus

MRP 1-6 (multidrug resistance protein)

MRP-1: gène en 16q13.1

Amplification du gène: chromosome-minute, etc...

Transgénèse du gène dans les cellules hématopoïétiques normales pour les protéger lors d'une chimiothérapie

protéine isolée de K pulmonaire après doxorubicine

substrats préférentiels:les ampholytes, mais aussi les neutres, les hydrophobes

## **DU GENE AU MEDICAMENT**

## 1/ trouver la relation gène / maladie

- \* Malade(s) -> génotypage: maladies génétiques
- \* Gènes "ténébreux" -> protéines -> fonctions? (relation protéine / maladie)

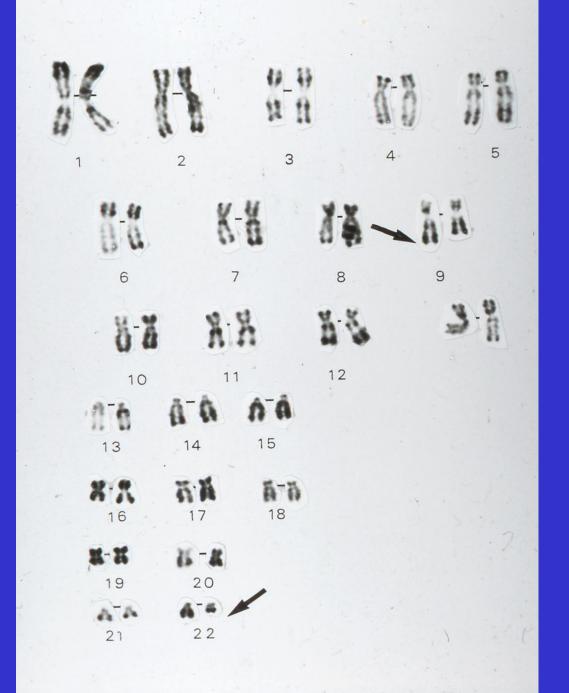
## 2/ trouver le médicament

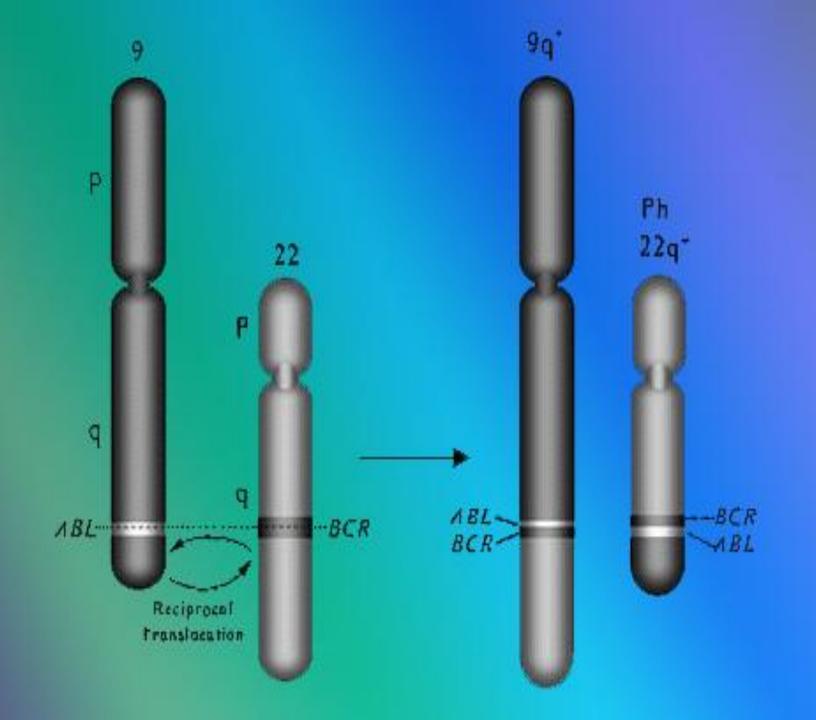
- \* gène-médicament = thérapie génique
- \* protéine-médicament: insuline, hormone de croissance, interféron
- \* ligand-médicament: molécule qui se lie à ADN ou ARN ou à la protéine modulation de l'activité génomique fonctionnelle / substances disponibles nouvelles: ex. Imatinib (Glivec-Novartis) / gène Bcr-Abl dans la LMC.

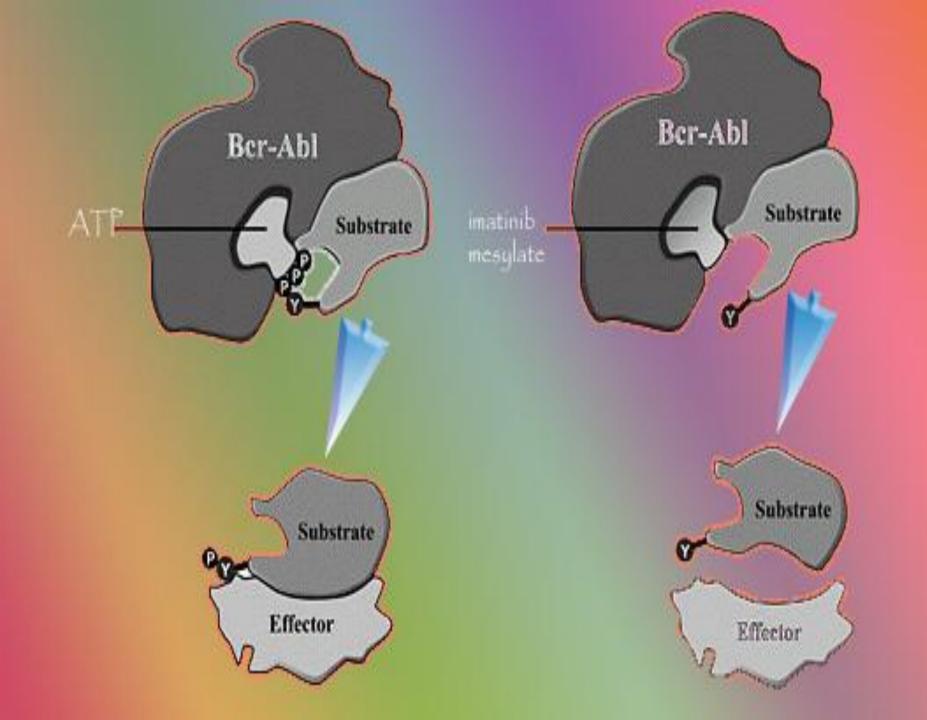
## 3/ produire le médicament

- \* synthèse en "tube" \* animaux: transgénèse: lait
- \* végétaux: transgénèse = bioréacteur végétal:

tabac: protéines (Hb) - vaccins comestibles (hépatite B)







# Production de médicaments-protéines par transgénèse

Qualité + Quantité

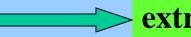
Ex.: insuline, hormone de croissance, EPO, facteur VIII, anti-thrombine III, interféron, anticorps monoclonaux, protéine C, alpha-antitrypsine, alpha-glucosidase, etc...

Bactéries + gène humain -> protéine: insuline, hormone croissance, etc...

- qualité: ex. problème de la glycosylation, carboxylation...
  - quantité: insuffisante

Solution: ex. mammifères: chèvre, porc, vache, lapin, souris + gène humain + promoteur gène lait

lait + protéine humaine



extraction

avantages: qualité / quantité - virus

inconvénients: transgénèse animale rendement faible: 1/100

usine biologique fragile





sur un génome qui n'en demandait

pas tant ...

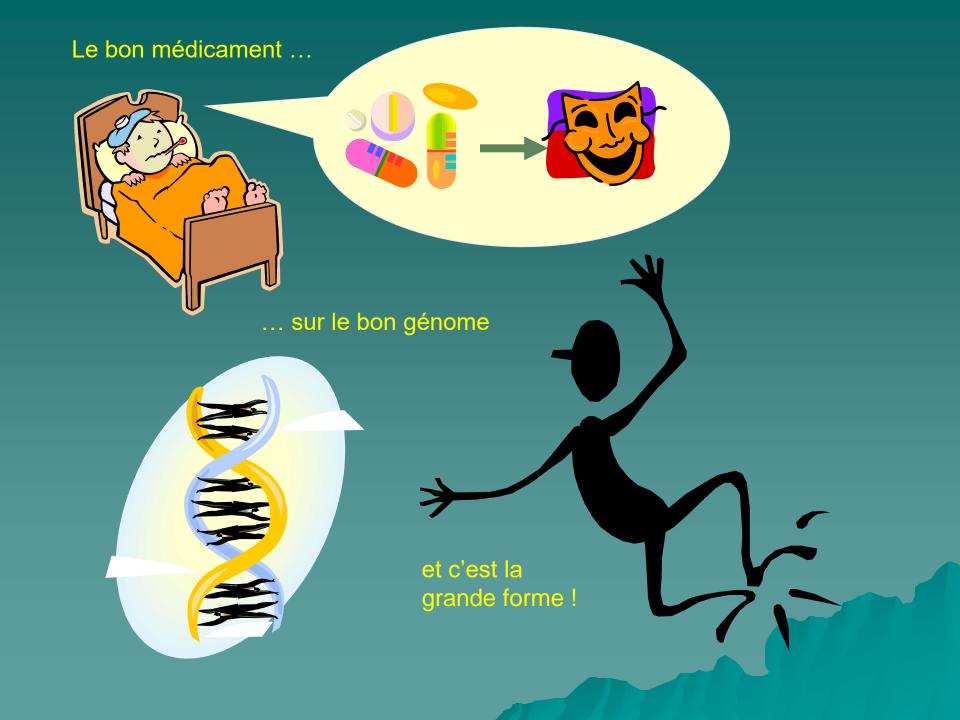


c'est le KO assuré !!!









## **En conclusion**

Toute acte thérapeutique est un choix entre les avantages et les inconvénients à court et long terme autorisés et mémorisés

par le patrimoine génétique

## Cas du distilbène (diéthylstiboetrol)

1948-1976 en France 400 000 femmes enceintes traitées pour risque de fausse couche entre la 6<sup>ème</sup> et la 17<sup>ème</sup>semaine d'aménorrhée

<u>Fœtus féminins</u> exposés *in utero*: malformations, stérilité, hypoplasie du col,...

**22 ans après** chez 1 sur 1 000 fœtus exposés : adénocarcinome à cellules claires du vagin et du col ;

prématurité, fausses couches tardives

Fœtus mâles exposés in utero:

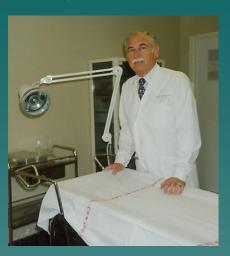
kyste de l'épididyme, cryptorchidie, hypo ou épispadias, induration capsulaire

1971: USA premiers cas de K du vagin

1975: premiers cas en France

# La génétique nouvelle est arrivée ?











avec de l'ancien ...

