

LES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES HUMAINES: APPARITION, DIAGNOSTIC ET APPROCHES THERAPEUTIQUES

7h CM; 3h TD; 24h TP (15h Biol. Mol. + 9h Biol. Cell.)

=> responsable des enseignements BioMol&Cell:
Bernard CARCY (bernard.carcy@umontpellier.fr)

Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire,
Faculté de Pharmacie, Université Montpellier

Introduction générale

- 2^{ème} semestre de la 2^{ème} année (S4)

UE	Coef Examens	Note	ECTS	Durée Ecrit (h)
UE2-7 Sciences analytiques et statistique appliquée (Chimie analytique, statistique appliquée)	TP – TD CC* : 30% - Ecrit : 70%	60	6	2
UE2-8 Biodiversité 1 (Bactériologie/Virologie)	Ecrit : 100%	20	2	1
UE2-9 Biodiversité 2 (Biologie animale, Parasitologie/Mycologie médicale)	Ecrit : 100%	20	2	1
UE2-10 Biodiversité 3 (Botanique, Mycologie)	TP CC* : 30% Ecrit : 70%	30	3	1,5
UE2-11 Sciences Biologiques 2 (Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie métabolique et Enzymologie)	TP CC* : 30% Ecrit : 70%	70	7	2,5
UE2-12 Sciences pharmacologiques (Pharmacocinétique, Pharmacologie, Toxicologie)	TP CC* : 10% - Ecrit : 90%	40	4	1,5
total			24	

*CC contrôle continu

UE2-11 (70points):
Ecrit: 49 points
TP(CC): 21points

• UE2-11 Sciences biologiques 2 - 7 ECTS

Référent : Pr Eric Raynaud de Mauverger eric.raynaud-de-mauverger@univ-montp1.fr

o Biologie cellulaire et moléculaire : 7h CM, 3h TD, 24h TP

Responsable : Dr Bernard Carcy bernard.carcy@univ-montp1.fr

Acquérir/Approfondir des connaissances théoriques et pratiques de base en Biologie Moléculaire et Cellulaire concernant les manipulations génétiques en vue d'applications médicales et pharmaceutiques actuelles et futures.

Cours :

Clonage et production de molécules thérapeutiques par génie génétique : Création et sélection d'OGM simple ou complexes;

Purification de protéines recombinantes dans ces organismes; Thérapie génique (ADN médicament) et clonage thérapeutique/reproductif.

Diagnostic des mutations délétères à l'origine des maladies héréditaires monogéniques : Les polymorphismes du génome humain (SNP, RFLP, répétitions) ; Mécanismes et conséquences des mutations délétères à l'origine des maladies héréditaires monogéniques; Méthodes d'identification des mutations; 4-Exploitation du génome humain et de ses polymorphismes (relation génome/Santé future...).

TD :

Identification d'un vecteur recombinant et clonage moléculaire en vue de production d'une protéine recombinante thérapeutique. Détection de mutations dans le génome humain.

TP :

Biologie Moléculaire : Transformation bactérienne et sélection colorimétrique de bactéries recombinantes ; Extraction, dosage et électrophorèse d'ADN plasmidique ; Identification d'un vecteur recombinant par digestion enzymatique et PCR ; Extraction d'ADN génomique humain et amplification par PCR de polymorphismes (SNP/RFLP et de répétition) ; Mise en évidence d'un RFLP et analyse des polymorphismes amplifiés (hétérozygotie/homozygotie).

Biologie Cellulaire : Fractionnement cellulaire (lyse + centrifugation) ; Détection d'activités enzymatiques de « marqueurs » des compartiments cellulaires (ex : phosphatase...) ; Electrophorèse des protéines SDS-PAGE

o Biochimie métabolique et Enzymologie : 33h CM, 4,5h TD, 6h TP

Responsable : Pr Eric Raynaud de Mauverger, PU-PH eric.raynaud-de-mauverger@univ-montp1.fr

Comprendre les interrelations, les mécanismes généraux de régulation et les dysfonctionnements métaboliques : au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire.

Cours :

Le métabolisme : un ensemble de réactions couplées et interconnectées.

Cinétique enzymatique.

Stratégies de régulation de l'activité des enzymes : compartimentation cellulaire, contrôles allostériques, isoenzymes et régulation « tissu-spécifique », modifications covalentes, clivage protéolytique, ajustement des niveaux d'enzymes (quantité et activité : contrôles hormonaux), régulation transcriptionnelle.

Sites de contrôle spécifiques des voies métaboliques essentielles : glycolyse, cycle de l'acide citrique, complexe de la pyruvate déshydrogénase, voie des pentoses phosphate, néoglucogenèse, synthèse et dégradation du glycogène, synthèse et dégradation des acides gras.

Notion de « carrefours métaboliques » : glucose 6-phosphate, pyruvate, acétyl-CoA.

L'ATP : unité universelle d'énergie libre des systèmes biologiques. Régulation de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Profils métaboliques spécifiques des organes ou tissus : cerveau, muscle strié squelettique, muscle cardiaque, tissu adipeux, rein, foie.

Exemples intégrés : adaptations métaboliques lors des phases postprandiale, postabsorptive et de jeûne ; adaptations métaboliques lors de la naissance ; les sources d'énergie au cours d'un exercice (intensité, durée) ; le métabolisme cardiaque en situation physiologique et en situation d'ischémie.

Bases cellulaires et moléculaires des maladies héréditaires du métabolisme

TD :

Biochimie moléculaire et cellulaire : Identification d'un vecteur recombinant et clonage moléculaire en vue de production d'une protéine recombinante thérapeutique ; Détection de mutations dans le génome humain.

Biochimie métabolique: Exercices d'enzymologie appliquée.

PLANNING CM/TD (B. Carcy)

=> CM1-2 le lundi 07/01 de 14-16h

- Introduction générale (problématique)

I- POLYMORPHISMES DU GENOME HUMAIN ET PATHOLOGIE MOLECULAIRE (MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES)

=> **A LIRE CHEZ SOI POUR DETAILS**

II- MECANISMES ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES

=> **A LIRE CHEZ SOI POUR DETAILS**

⇒ CM3-4 le mardi 8/01 de 14-16h

⇒ TD1: *mercredi 9/01; 9h-10h30 et 10h30-12h (**série D puis C pour étudiants SKI**)
*Mardi 15/01; 10h30-12h (série E)
*Mercredi 16/01; 9h-10h30 et 10h30-12h (série B puis A)

III- METHODES D'IDENTIFICATION (A) DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES GENETIQUES HEREDITAIRES MONOGENIQUES ET APPLICATIONS (DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE (B) ET AUTRES APPLICATIONS (C))

⇒ CM5-6 le lundi 14/01 de 10-12h et CM7 le jeudi 17/01 de 17-18h

⇒ TD2 : *lundi 21/01 (série E puis B; 9h-10h30 puis 10h30-12h00, respectivement; série A 14-15h30 en salle CT5 Usine),

*mercredi 23/01 (**série D puis C; 9h-10h30 puis 10h30-12h; pour étudiants SKI**)

IV- APPROCHES THERAPEUTIQUES DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (TRANSFERT DE GENE : CLONAGE (A) et APPLICATIONS(B))

I- TP Biologie Moléculaire (15h; 3TP; B. Carcy/A. Graindorge/L. Alcaraz-Cacchia)

A- Clonage moléculaire (9h)

TP1 (3h): transformation bactérienne et sélection colorimétrique (Bleu/blanc) des bactéries contenant un vecteur recombinant.

TP2 (6h): extraction/dosage d'ADN plasmidique (miniprep) et analyse sur gels d'agarose des inserts par digestion des vecteurs à l'aide d'enzymes de restriction ou par PCR ; Caractérisation de polymorphismes sur les inserts

B- Identification de polymorphismes (RFLP et de répétition) humains (6h)

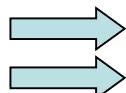
(Note : **TPs DE SCIENCES PHARMACOLOGIQUES UE2-12 (6h) EN MEME TEMPS**)

Chaque étudiant extrait son propre ADN et analyse sur gel d'agarose ses profils (homozygotes ou hétérozygotes) pour 3 marqueurs génétiques amplifiés par PCR:

=> **TP3 Bio.Mol.(6h):** analyse de séquences répétées par PCR (Insertion Alu sur chromosomes 8 et détermination du nombre de VNTR pMTC118 sur chromosomes 1) ;

=> **TP Sc. Pharmacol. UE2-12 (6h) :** mise en évidence de RFLP sur cytochrome p450.

II- TP Biologie Cellulaire (9h; 2TP; K. Moubri-Ménagé/S. Delbecq/L. Alcaraz-Cacchia)



Frottis/coloration cellulaire et observation microscopique (**TP1; 3h**)

Fractionnement cellulaire, Electrophorèse SDS-PAGE et Western blot (**TP2; 6h**)

UE optionnelles le plus en relation avec ces enseignements d'UE11

Unités Optionnelles DFGSP-2 Maladies héréditaires du métabolisme

Enseignants co-responsables : Pr. Eric RAYNAUD de MAUVERGER

Enseignants intervenants: Pr. Eric RAYNAUD de MAUVERGER, Pr. Sophie MARY (Biochimie métabolique et clinique). Dr. Stéphane DELBECQ, Dr. Bernard CARCY (Biologie cellulaire et moléculaire)

Dr. Virginie RAGE-ANDRIEU (Droit et économie de la Santé) Dr. Cyril BREUKER, Dr. Audrey CASTET-NICOLAS (Pharmacie clinique). Olivier de RETZ (GENZYME, A Sanofi Company)

Niveau	Public(s) concerné(s) : Etudiants inscrits à la 2 ^{ème} année du DFGSP
Objectif(s) :	Présentation de l'UE : UE fondamentale et pré-clinique
Capacité d'accueil maximale :	Donner un modèle d'application directe des enseignements de biochimie métabolique, biologie cellulaire et moléculaire, génétique, circuit du médicament, bioéthique en abordant les maladies héréditaires du métabolisme (MHM).
70 étudiants	
3 ECTS	PROGRAMME DES ENSEIGNEMENTS
Cours : 24h (2,6 ECTS)	Physiopathologie cellulaire des MHM (4h) Dr. DELBECQ Outils moléculaires pour le diagnostic (3h) Dr CARCY MHM : une classification ? (1h) Pr. RAYNAUD de MAUVERGER Myopathies métaboliques (2h) Pr. RAYNAUD de MAUVERGER Cytopathies mitochondrielles : actualités (1h) Pr. RAYNAUD de MAUVERGER Aminoacidopathies héréditaires (2h) Dr. MARY Maladies lysosomales (3h) Pr. RAYNAUD de MAUVERGER MHM : de l'enfant à l'adulte (1h) Pr. RAYNAUD de MAUVERGER Droit et bioéthique des maladies orphelines (3h) Dr. RAGE-ANDRIEU Principes généraux de prise en charge (2h) Dr. BREUKER L'enzymothérapie substitutive : présent et futur (conférence GENZYME, 2h)
TD : 6h (0,4 ECTS)	TD intégrés : analyse de cas et d'articles de vulgarisation 6h séances de 4h
MCC	Epreuve écrite intégrant questions de cours, analyse de cas et d'articles de vulgarisation. Durée : 1h30. Notation sur 30 points.
Observations particulières	Enseignement en présentiel. Présence obligatoire des étudiants aux enseignements (cours et TD)

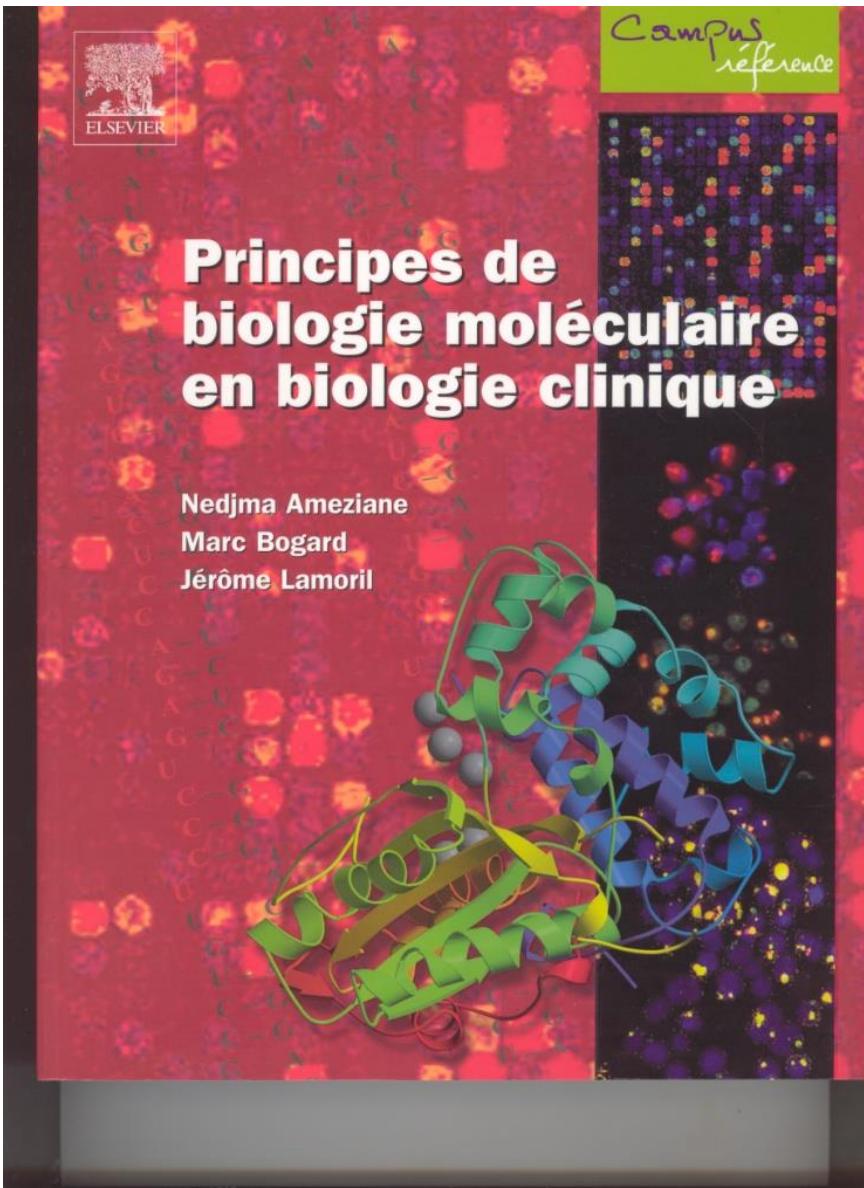
Unités Optionnelles DFGSP-2 Evolution et diversité du génome humain en relation avec la santé

Enseignant responsable : Emmanuel Cornillot

Enseignants intervenants : Emmanuel Cornillot, Valérie Cacheux, Melina Alame, Jacques Collinge, Karim Moubri-Mangas

Niveau	Public(s) concerné(s) : Etudiants de DFGSP2 S1 ou S2
Objectif:	L'objectif est de présenter la structure du génome humain, son évolution depuis l'origine de l'espèce et les variations que l'on peut observer. Il s'agit de montrer les variations normales et pathologiques en traitant d'exemple connus et de données cliniques. Le cours traitera aussi des outils nécessaires à l'analyse du génome d'un point de vue théorique, mais aussi d'un point de vue pratique, en TP sur ordinateur.
Capacité d'accueil maximale :	20 étudiants
3 ECTS	
Cours : 20h TD : 6h TP : 4h	<p>Programme des enseignements</p> <p>Cours :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Méthodes d'étude 2. Composition du génome L'ADN Les gènes Les groupes de liaison 3. Variations au sein du génome La recombinaison Les SNPs Les variations structurales Les éléments transposables 4. L'expression du génome Les promoteurs La régulation épigénétique Les réseaux issus du génome humain Métabolisme, interactions protéines-protéines, coexpressions, ... <p>L'exemple de l'hémoglobine et du cancer seront deux thématiques qui serviront d'exemple tout au long des cours avec de nombreuses autres illustrations.</p> <p>TD (séances de 2h) : Analyse de pedigree, conseil génétique, analyse de cas cliniques. TP (séances de 2h) : Biométrie à partir des bases de données. Séances sur ordinateur.</p>
Modalités de contrôle des connaissances	<p>1^{ère} session :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une note de contrôle continu de Travaux Pratiques : 5 - Une note d'analyse de document en TD/10 - Une note d'oral avec préparation : 15 <p>2^{ème} session :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Seul un oral sera passé en 2^{ème} session/30 <p>Note finale sur 30</p>
Observations particulières	La présence aux TD et au TP est obligatoire.

Ouvrages de références



biologie moléculaire et médicale

JEAN-CLAUDE
KAPLAN

MARC
DELPECH

biologie moléculaire et médecine

2^e ÉDITION

Médecine-Sciences
Flammarion

**CM: LES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES
HUMAINES: APPARITION, DIAGNOSTIC ET
APPROCHES THERAPEUTIQUES**

-CHAPITRE I -

**POLYMORPHISMES DU GENOME HUMAIN ET PATHOLOGIE
MOLECULAIRE (MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES)**

Bernard CARY

**Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Université
Montpellier**

I- POLYMORPHISMES DU GENOME HUMAIN ET PATHOLOGIE MOLECULAIRE (MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES)

A- GENOME HUMAIN

- Composition (ADN nucléaire et mitochondrial) et organisation générale
- Les séquences répétées (dispersées et en tandem)
- Les séquences géniques (gènes, ADNc, sites consensus d'épissage, cadre de lecture ouvert)
- Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

B- POLYMORPHISMES (MUTATIONS/VARIATION DE SEQUENCE)

- Mutations rapportées dans la littérature (micro et macrolésions)
- Définition et Nomenclature
- les différents types de polymorphisme (bi- ou multialléliques, épigénétiques, mitochondrial)

C- PATHOLOGIES INDUITES PAR LES VARIATIONS DE SEQUENCES

- Pathologies dues à des SNP et STR (incluant les MHM)
- Pathologie dues à des épimutations (dont l'empreinte Génomique)
- Pathologie mitochondriale

D- LES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (MHM)

- Généralités
- Transmission
- Relation génotype/phénotype

II- MECANISMES ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES

III- METHODES D'IDENTIFICATION DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES GENETIQUES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE)

IV- APPROCHES THERAPEUTIQUES DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (TRANSFERT DE GENE)

LE LIVRE DE LA VIE, OU DE LA CELLULE AU CHROMOSOME

1 Le corps humain est formé de cellules, environ une centaine de milliards



2 Les cellules contiennent un noyau



5 Les gènes constitués d'un enchaînement de bases de longueur variable servent à produire des multiples protéines qui assurent le bon fonctionnement des cellules et de l'ensemble de l'organisme.

3 Dans le noyau de la cellule, se trouvent vingt-trois paires de chromosomes.

Chacun est composé d'une longue molécule enroulée en double hélice sur elle-même : l'**ADN** (acide désoxyribonucléique), support de notre patrimoine héréditaire.

Filament d'ADN

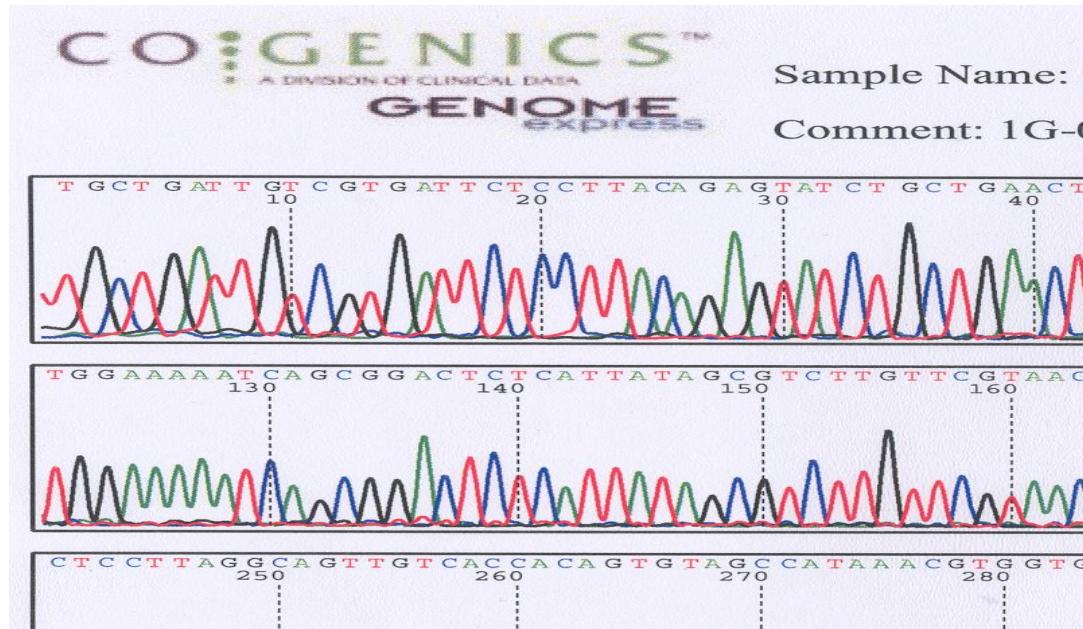
Chromosome

4 Déroulés et alignés bout à bout, ces 23 chromosomes formeraient un filament d'ADN de plus de 1 m de long. Les barreaux de l'échelle de sa double hélice sont formés à partir de 4 bases - G (guanine), C (cytosine), A (adénine) et T (thymine) -, associées par paires et dont la succession détermine la séquence des gènes. **Le génome humain est constitué, dans son ensemble, de 3 milliards de bases.**

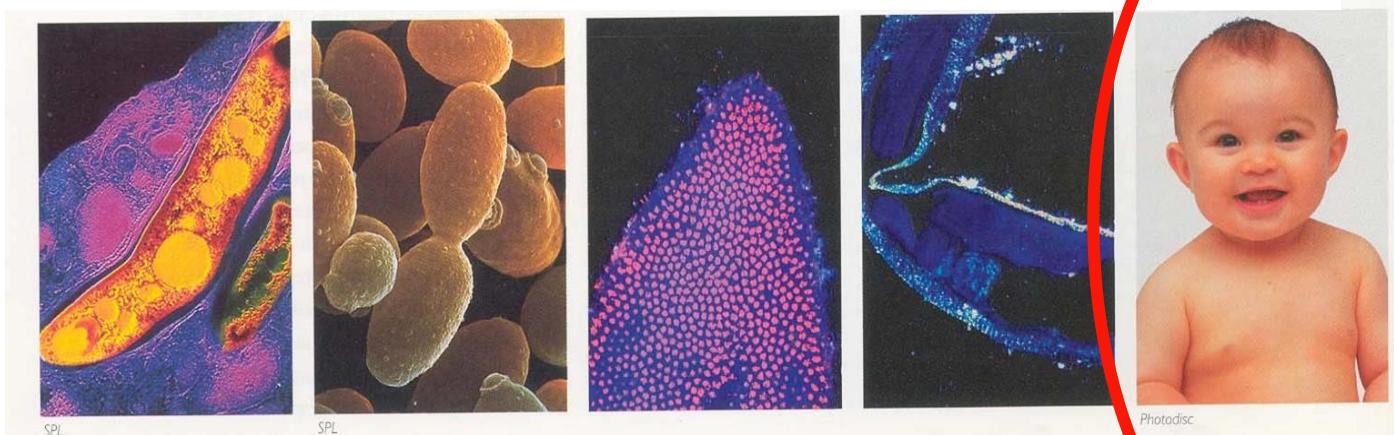
double hélice d'ADN paire de bases (GTAC)

Tableau D. ADN mitochondrial et nucléaire

ADN nucléaire (ADNg)	ADN mitochondrial (ADNmt)
Un ADN dans le noyau	Environ 1000 ADNmt/cellule
Transmission par les deux parents	Transmission maternelle
3 milliards de pb	16,5 kb
Organisation promoteur, région 5' non codante, exons/introns, région 3' non codante	Pas d'intron
≈ 25 000 gènes	37 gènes codés par l'ADNmt : - si pathologie : hétéroplasmie mélange d'ADNmt normal et pathologique (ADNmtN et ADNmtM, respectivement) - effet seuil : dans une cellule, le rapport ADNmtN/ADNmtM doit dépasser un seuil pour que le phénotype se déclare (notamment défaut de la chaîne respiratoire) - variabilité du nombre d'ADNmt muté intracellule et/ou intra-tissu et/ou intra-organes et/ou intrafamiliale Interaction ADNg et ADNmt
23 paires de chromosomes: -22 autosomiques de 249 (ch1) à 54 (ch21) Mpb -1 sexuelle (141 Mbp pour X et 60 Mpb pour Y)	
- 0,1% de variation entre 2 individus	



ORGANISME mycobactéries levure Drosophile ver nématode Homme



NBRE GENE

4000

6000

13000

18000

25000

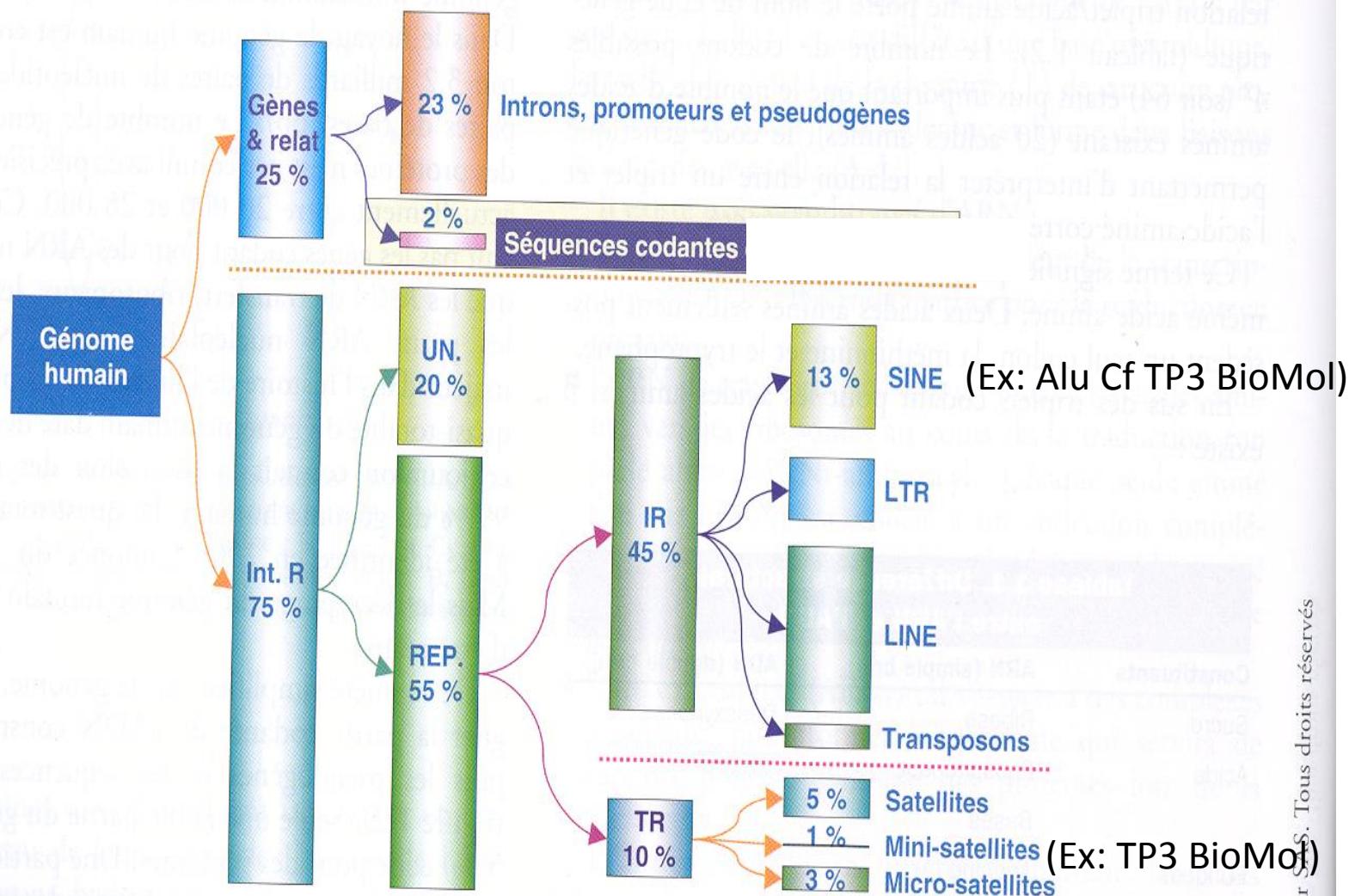


Figure 1.2 Composition générale du génome humain. Le pourcentage représente la quantité de séquences par rapport à la séquence totale connue du génome. Gènes & relat : gènes et séquences associées ; Int. R : régions intergéniques ; Un. : séquences intergéniques uniques ; Rep. : séquences intergéniques répétitives ; IR : séquences intergéniques répétitives dispersées ; TR : séquences intergéniques répétées en tandem. SINE: petit élément nucléaire intercalé; LINE: grand élément nucléaire intercalé

⇒ Dans le génome humain, on distingue principalement **deux types de séquences répétées (55 % du génome)** :

• **Séquences répétées en tandem (10 % du génome):**

Séquences **microsatellites** (3-4 % du génome):

- séquences de 1 à 5 pb (**STR**: Short Tandem Repeat) répétées un grand nombre de fois (jusqu'à plusieurs kbp)

Séquences **minisatellites** (1-2% du génome):

- séquences de 15 à 25 pb le plus souvent (**VNTR**: Variable Number of Tandem Repeat ; max 150pb) répétées un grand nombre de fois (**Cf TP3 BioMol**)

Grands blocs d'ADN **satellite** (environ 5 % du génome humain) :

- blocs allant jusqu'à une dizaine de mégabases, localisés très majoritairement au niveau des centromères et télomères

• **Séquences répétées dispersées** (chez les vertébrés) réparties sur l'ensemble du génome (45 % du génome) :

Petits éléments nucléaires intercalés (**SINE : Small Interspred Nuclear Element**) : leur taille varie entre 130 et 500 pb, les plus abondantes chez l'homme sont les **séquences ALU (cf TP3 BioMol)**

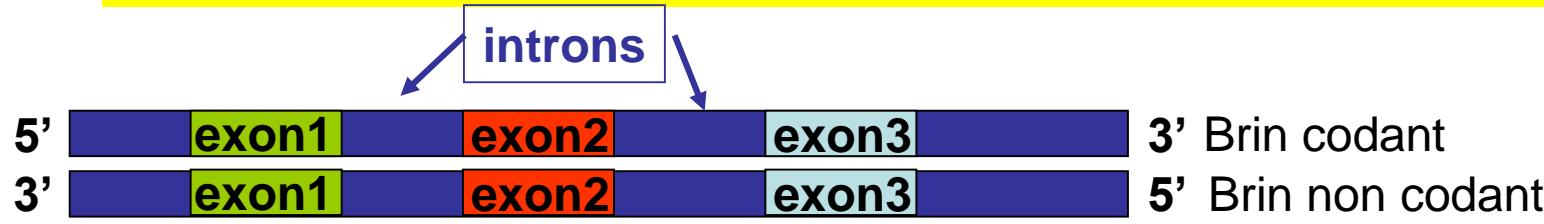
Longs éléments nucléaires intercalés (**LINE :Large Interspred Nuclear Element**) : leur taille est de quelques kpb (6 à 7 kpb).

Séquences terminales longues répétées (**LTR : Long Terminal Repeat**) : généralement des éléments de relativement petite taille, présents en très grand nombre (~ 400 000 copies).

Transposons d'ADN : ils représentent environ 300 000 copies et sont issus de la transposition de certains gènes d'une partie d'un chromosome, voire d'un chromosome complètement différent, vers une autre partie du génome.

* Rappels 1 sur les notions d'ADNg (ou ADNc), d'ARNm et de protéines

ADNg (gène dans un génome eucaryote: intron + exon + 5' NC et 3' NC)

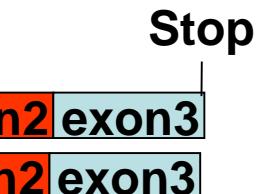


ARNm mature :
-1 seul cadre de lecture ouvert
(Open Reading Frame=ORF)

Nter Cter

protéine

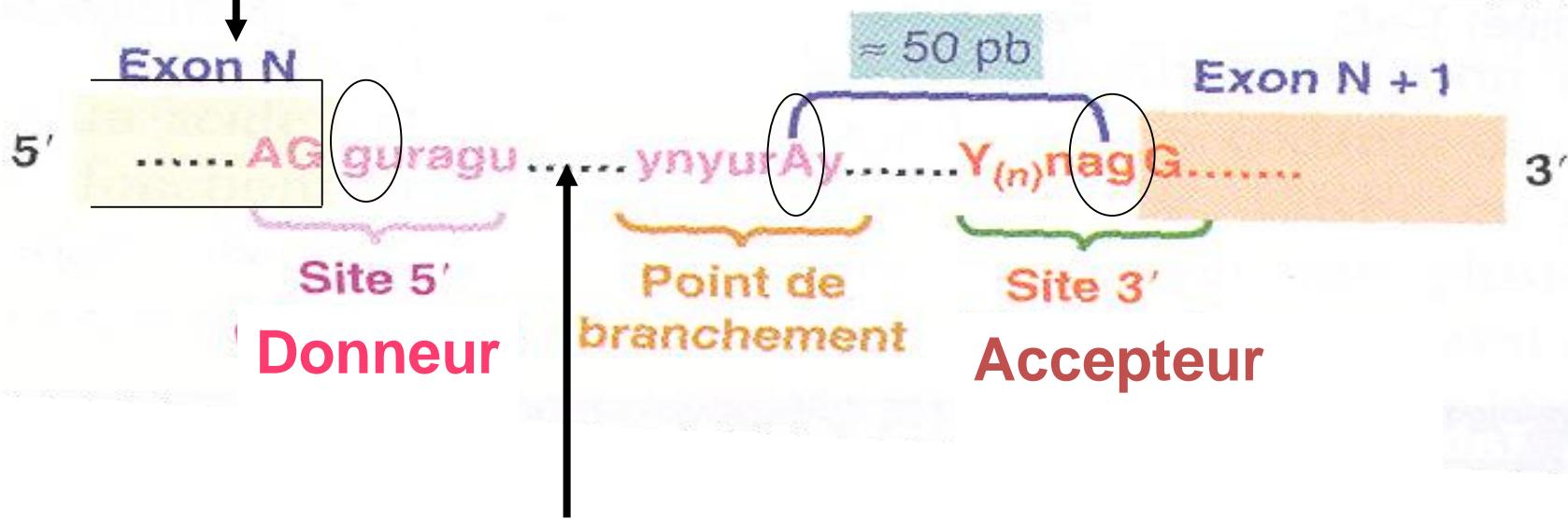
	Seconde base				
	U	C	A	G	
première base	Phe Leu	Ser Leu	Tyr Ser	Cys STOP	U C A G
C	Leu Leu	Pro Leu	His Gln	Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Met	Thr Thr Thr	Asn Asn Lys	Ser Ser Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G



ADNc (ADN complémentaire)
copie ADN double brin issue
d'un ARNm mature)

- ESE (Exonic Splicing Enhancer)
- ESS (Exonic Splicing Silencer)

A



- ISE (Intronic Splicing Enhancer)
- ISS (Intronic Splicing Silencer)

u= base pyrimidique (C, T); r= base purique (A, G); n= n'importe quelle base

* Rappels2 sur la notion de cadre de lecture ouvert (orf) d'un gène

5' - ATGTATGACGTAACGTAA – 3' brin sens (codant)

3' - TACATACTGCATTGCATT – 5' brin anti-sens (non codant)

=> Brin sens (orienté 5' vers 3'):

5' - ATGTATGACGTAACGTAA - 3' => il existe 1 cadre de lecture ouvert (orf) sur le brin codant

5' - ATG TAT GAC GTA ACG TAA – 3' (Orf=OUVERT)

5' - A TGT ATG ACG TAA CGT AA - 3' (FERME; +1)

5' - AT GTA TGA CGTAAC GTA A - 3' (FERME; +2)

=> Brin antisens, complémentaire du brin sens
(attention, orienté 5' vers 3'):

5' - TTACGTTACGTCATACAT - 3'

=> il n'existera pas de cadre de lecture ouvert (orf) sur le brin non codant

⇒ Pour une séquence d'ADN donnée, il existe 6 cadres de lecture possibles, mais 1 seul est ouvert (il est sur le brin codant et c'est lui qui donnera la protéine)

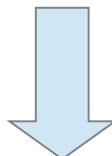
		Seconde base				
		U	C	A	G	
P r e m i e r e b a s e	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Troisième base

Diversité des individus
(0,1% de variation entre 2 individus)



LES MUTATIONS /POLYMORPHISMES/ VARIATIONS DE SEQUENCE DU GENOME HUMAIN



Pathologies
(mutation SNP si Fréquence >1% dans la population)

Variation in the genome

Uncovering the variations in the human genome – in particular the single nucleotide polymorphisms – is generating almost as much excitement as the sequence itself. A new map of 1.42 million SNPs, the output of the International SNP Working Group, will prove invaluable in the search for genetic contributions to common diseases.



The sequence in our genomes is 99.9 per cent identical to that of any other human – and to the ‘reference sequence’ deciphered by the Human Genome Project (HGP). A difference of 0.1 per cent may not sound a lot, but as the human genome is made up of 3.2 billion base pairs, the 3 million variants make us individuals and not clones.

As genes make up only a small percentage of the genomic information, many of the variations sprinkled so liberally across the genome fall outside of these crucial regions and do not influence human biology. But by finding those variations in or next to genes, researchers hope to find

out why some people are more susceptible to diseases such as cancer, diabetes or Alzheimer’s disease, and why some people respond well to certain drugs and others do not. Such information could herald an era of ‘personalized medicine’, with treatments tailored to our genetic make-up.

Several types of variations are found in the genome. Deletions, insertions and inversions of bits of DNA all occur, but the most common type – making up the bulk of the 3 million variations – are the single nucleotide polymorphisms (SNPs or ‘snips’), where a single base differs between individuals (being G instead of A, for

example). SNPs occur about once every 1000 base pairs in the genome, and the frequency of a particular polymorphism tends to remain stable in the population. The widespread nature of SNPs has only become apparent in the last few years; for many years, researchers have made use of another kind of variation – the ‘workhorse of human disease mapping studies’, the simple sequence repeat.

Above:
A difference of just 0.1 per cent in the sequence in our genomes makes us individuals.
Photodisc

Slippery customers
The sequence of bases in the genome is not always a seemingly random string of Gs, As, Ts and Cs. In some places, the same

Figure 1: Identification of SNPs and their association with disease.

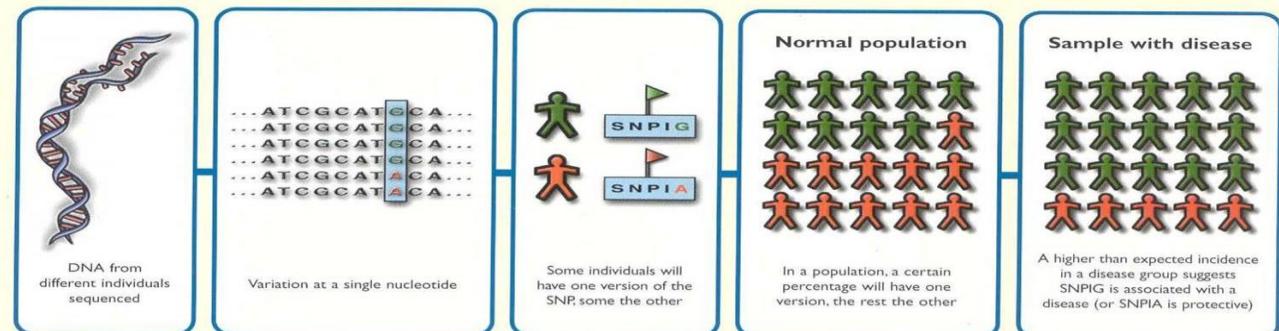


Tableau 2.2. Mutations rapportées dans la littérature (2093 gènes analysés)
 (référence : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/docs/hohoho.html>)

Mutation	Nombre	%
Microlésions :		
– mutations ponctuelles (non-sens, faux-sens)	31 251	57,3
– épissage	5188	9,5
– zones de régulation de l'expression	700	1,3
– petites délétions	9014	16,5
– petites insertions	3626	6,6
– petites insertions/délétions	533	1
Macrolésions :		
– variation de séquences répétées	143	0,2
– grandes insertions ou duplications	470	0,9
– réarrangements complexes (incluant les inversions)	639	1,2
– grandes délétions	2998	5,5
Total	54 562	100

SNP

Les SNP sont les variants les plus fréquents dans le génome humain

Seq Repétées

-microlésions (petites taille):

Ce sont des substitutions, suppressions ou additions **d'un ou de quelques nucléotides**

Macrolésions (grande taille):

Ce sont des réarrangements géniques complexes (grande insertion, duplication, Inversion, délétion, translocation) dont la taille peut aller de **quelques kpb à plusieurs Mpb**.

Examples of notable Mutations

ΔF508
deletion
in cystic
fibrosis

		2nd base			
		U	C	A	G
3rd base in each row	U	UUU (Phe/F) Phenylalanine	UCU (Ser/S) Serine	UAU (Tyr/Y) Tyrosine	UGU (Cys/C) Cysteine
	U	UUC (Phe/F) Phenylalanine	UCC (Ser/S) Serine	UAC (Tyr/Y) Tyrosine	UGC (Cys/C) Cysteine
	U	UUA (Leu/L) Leucine	UCA (Ser/S) Serine	UAA Ochre (Stop)	UGA Opal (Stop)
	U	UUG (Leu/L) Leucine	UCG (Ser/S) Serine	UAG Amber (Stop)	UGG (Trp/W) Tryptophan
3rd base in each row	C	CUU (Leu/L) Leucine	CCU (Pro/P) Proline	CAU (His/H) Histidine	CGU (Arg/R) Arginine
	C	CUC (Leu/L) Leucine	CCC (Pro/P) Proline	CAC (His/H) Histidine	CGC (Arg/R) Arginine
	C	CUA (Leu/L) Leucine	CCA (Pro/P) Proline	CAA (Gln/Q) Glutamine	CGA (Arg/R) Arginine
	C	CUG (Leu/L) Leucine	CCG (Pro/P) Proline	CAG (Gln/Q) Glutamine	CGG (Arg/R) Arginine
3rd base in each row	A	AUU (Ile/I) Isoleucine	ACU (Thr/T) Threonine	AAU (Asn/N) Asparagine	AGU (Ser/S) Serine
	A	AUC (Ile/I) Isoleucine	ACC (Thr/T) Threonine	AAC (Asn/N) Asparagine	AGC (Ser/S) Serine
	A	AUA (Ile/I) Isoleucine	ACA (Thr/T) Threonine	AAA (Lys/K) Lysine	AGA (Arg/R) Arginine
	A	AUG (Met/M) Methionine	ACG (Thr/T) Threonine	AAG (Lys/K) Lysine	AGG (Arg/R) Arginine
3rd base in each row	G	GUU (Val/V) Valine	GCU (Ala/A) Alanine	GAU (Asp/D) Aspartic acid	GGU (Gly/G) Glycine
	G	GUC (Val/V) Valine	GCC (Ala/A) Alanine	GAC (Asp/D) Aspartic acid	GGC (Gly/G) Glycine
	G	GUA (Val/V) Valine	GCA (Ala/A) Alanine	GAA (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine
	G	GUG (Val/V) Valine	GCG (Ala/A) Alanine	GAG (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine

Selection of notable mutations, ordered in a standard table of the genetic code of amino acids.

Clinically important missense mutations generally change the properties of the coded amino acid residue between being basic, acidic, polar or nonpolar, while nonsense mutations result in a stop codon.

Amino acids

- Basic
- Acidic
- Polar
- Nonpolar (hydrophobic)

Fragile X Syndrome

Polyglutamine (PolyQ) Diseases

- Huntington's disease
- Spinocerebellar ataxia (SCA) (most types)
- Spinobulbar muscular atrophy (Kennedy disease)
- Dentatorubral-pallidoluysian atrophy

Mutation type

- = Trinucleotide repeat
- = Deletion
- = Missense
- = Nonsense

- Selon les auteurs, **polymorphisme** peut signifier :
 - un changement de séquence sans conséquence pathologique
 - un changement de séquence dont la fréquence est $>1\%$ dans la population générale
- Selon les auteurs, **mutation** peut signifier :
 - un changement de séquence, quelle que soit la conséquence
 - un changement induisant une pathologie



Les auteurs de la **nomenclature utilisent donc le terme variation de séquence** pour éviter toute confusion avec les termes polymorphisme et mutation (**voir nomenclature**)

=> Ce sont des variations de séquence d'un locus donné, d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce.

NOMENCLATURE DES VARIATIONS DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

B- LES POLYMORPHISMES/MUTATIONS

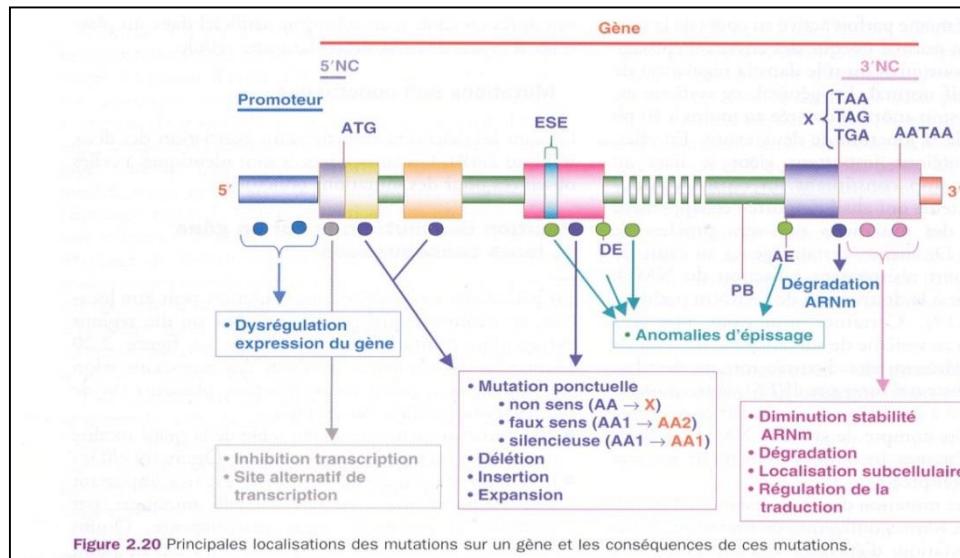


Figure 2.20 Principales localisations des mutations sur un gène et les conséquences de ces mutations.

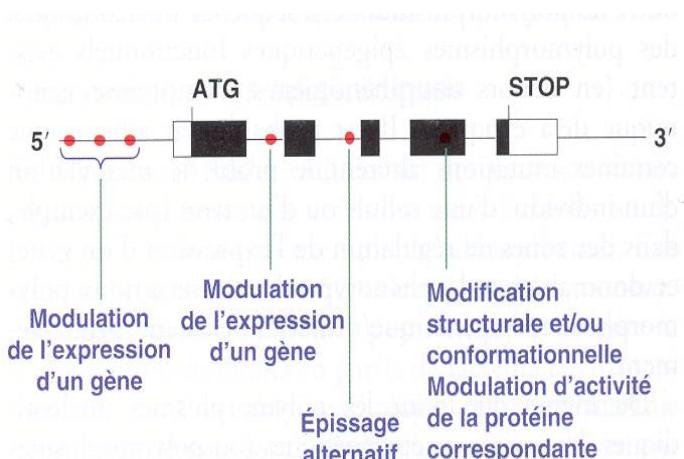


Figure 2.10 Conséquences fonctionnelles et/ou structurales potentielles des polymorphismes fonctionnels.

=> une variation de séquence peut être localisée en n'importe quel point d'un gène ou des régions extragéniques interagissant avec lui.

=> Les conséquences de ces variations de séquences selon leur localisation sont variables

=> Ces variations de séquences peuvent être exprimées au niveau de l'ADN, l'ARN et/ou de la protéine.

=> Les principales modifications pour la description des variations de séquences (que ce soit au niveau ADN, ARN ou protéine) concernent :

- les mutations ponctuelles (substitutions)
- les insertions
- les délétions
- les duplications
- les inversions

Nomenclature pour la description des mutations et autres variations de séquence

B- LES POLYMORPHISMES/MUTATIONS

Code:

substitution (pour les bases)	>
étendue	-
autres changements sur l' allèle	;
autres transcripts/mosaique	,
incertain	0
allèle	[]
délétion	del
duplication	dup
insertion	ins
inversion	inv
conversion	con
extension	ext
codon stop	X
décalage du cadre de lecture	fsX
brin opposé	o
translocation	t

Indication de la séquence référence:

ADN		
	ADN codant	c.
	ADN génomique	g.
	ADN mitochondrial	m.
ARN		r.
Proteïne		p.

⇒ ajouter c, g ou m au début de la nomenclature selon la nature de l'ADN

-**Les substitutions (mutations ponctuelles):** désignées par le caractère « > »:

* **76A>C** signifie qu'au niveau du nucléotide 76, le A est substitué en C.

* **89+1G>T** signifie qu'au niveau de l'intron, le G (en position +1 dans l'intron) a été substitué en T (la position 89 étant celle du 89ème nucléotide dans l'ADNc)

***90-2A>C** (ou IVS2-2A>C) signifie qu'au niveau de l'intron, le A (en position -2 dans l'intron) a été substitué en C (la position 90 étant celle du 90ème nucléotide dans l'ADNc)

-**Les délétions,** désignées par l'abréviation « **del** »:

* **76_78delACT** (ou 76_78del) signifie une délétion de 3 nucléotides (ACT) des positions 76 à 78.

-**Les insertions,** désignées par l'abréviation « **ins** »:

***76_77insT** signifie l'insertion du nucléotides T entre les nucléotides 76 et 77.

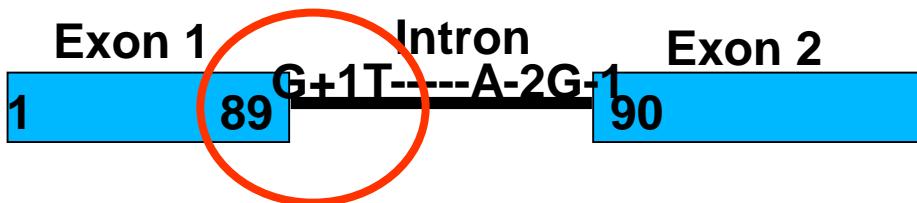
-**Les duplications,** désignées par « **dup** »:

***586_591dup** signifie « duplication du segment qui va de la position 586 à la position 591 »

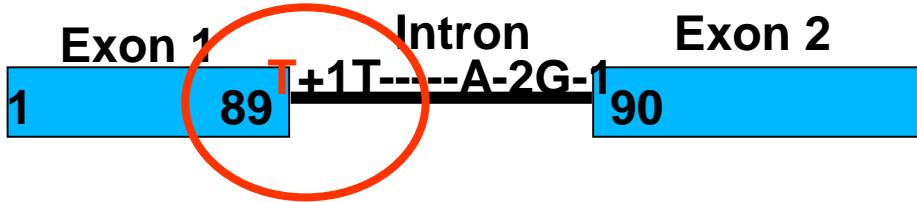
Au niveau des introns:

-Au début de l'intron: on donne le numéro du dernier nucléotide de l'exon précédent puis le signe + suivi de la position dans l'intron

-Ex: **g.89+1G**, 89 est le numéro du dernier nucléotide de l'exon précédent l'intron et G est en 1ere position sur l'intron)

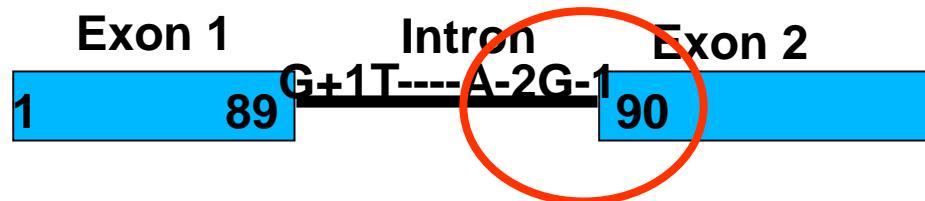


Donc g.89+1G>T signifie:

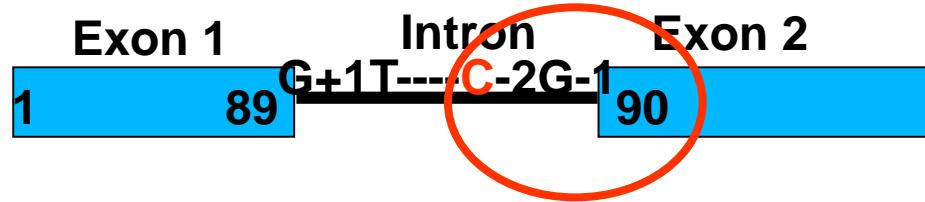


-A la fin de l'intron: on utilise la numérotation du premier nucléotide de l'exon suivant l'intron suivi d'un signe - et de la position du nucléotide en amont dans l'intron

-Ex: **g.90-1G**, 90 est le numéro du premier nucléotide de l'exon suivant l'intron et G est en dernière position de l'intron)



Donc g.90-2A>C signifie:



-Les substitutions:

- * modification **faux-sens**: **p.W26C** (ou trp26Cys) signifie qu'au niveau de l'acide aminé 26, le W (tryptophane) a été changé en C (cystéine).
- * modification **non-sens**: **p.W26X** (ou trp26X) signifie qu'au niveau de l'acide aminé 26, le W (tryptophane) a été changé en **codon-stop (X)**.

-Les délétions, désignées par l'abréviation « **del** »

- * **p.K29del** (ou Lys29del) signifie une délétion de l'acide aminé lysine (Lys ou K) en position 29.
- * **p.C28_M30del** (ou Cys28_Met30del) signifie une délétion de 3 acides aminés de la cystéine en position 28 à la methionine en position 30.

-Les insertions, désignées par l'abréviation « **ins** »:

- * **p.K29_M30insQSK** (ou Lys29_Met30insGlnSerLys) signifie l'insertion de 3 acides aminés (QSK ou glutamine/lysine/serine) entre les acides aminés lysine (K) en position 29 et methionine (M) en position 30. Ainsi la séquence ...CKMGH... devient ...CKQSKMGH...

-Les duplications, désignées par « **dup** »:

- **p.G4_Q6dup** signifie « duplication du segment à partir de G4 et jusqu'à Q6

Substitution	
c.123A>G	sur le cDNA, A, en position 123, est remplacé par G
p.P252R	sur la protéine, proline (P) remplacée par arginine (R)
Délétion	
c.546delT	délétion de T en 546
c.586_591del	six bases déletées
p.F508del	délétion de phenylalanine (F) en 508
Duplication	
c.546dupT	duplication de T en 546
c.586_591dup	duplication du segment 586 -> 591
p.G4_Q6dup	duplication du segment à partir de glycine (G) en 4 jusqu'à glutamine (Q) en 6
Insertion	
c.546_547insT	insertion de T entre 546 et 547
c.1086_1087insGCGTGA	insertion de GCGTGA
p.K2_L3insQS	insertion de glutamine/sérine entre lysine (K) en 2 et leucine (L) en 3
Inversion	
c.546_2031inv	segment 546 -> 2031 inversé
Décalage cadre de lecture	
p.R83SfsX15	arginine (R) est le premier acide aminé changé, c'est en position 83, cela donne une sérine (S) à la place, la taille du segment en aval est de 15, codon stop (X) inclus

Pour une description plus détaillée de la nomenclature des mutations, se référer à: [Nomenclature for the description of sequence variations](#) by the Human Genome Variation Society, [den Dunnen JT and Antonarakis SE \(2000\). Hum.Mutat. 15:7-12.](#)

1- BI-ALLELIQUES* (SNP; Insertion et/ou délétion, micro- ou macrolésions)
-inclus les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), qu'ils soient SNP ou non.

=> seulement 3 génotypes possibles (N/N ; N/M et M/M)

Mutation de type RFLP: Ce sont des variations de séquences touchant un site de restriction = une mutation pourra soit créer soit abolir un site de restriction

- Site de restriction = site nucléotidique de coupure strict de l'ADN par une enzyme de restriction
=> la moindre mutation dans la séquence d'ADN au niveau du site de coupure fait que l'enzyme ne pourra plus couper l'ADN
-Ex: site de coupure pour l'enzyme EcoRI est GAATTC => si mutation induit GACTTC alors EcoRI ne coupe plus l'ADN muté)

2- MULTI-ALLELIQUES*

- Séquences répétées de type STR/VNTR

=> n génotypes possibles

STR	MÈRE	ENFANT	PERE BIOLOGIQUE A?	PERE BIOLOGIQUE B?
PentaE	7	12	7	15

4 génotypes

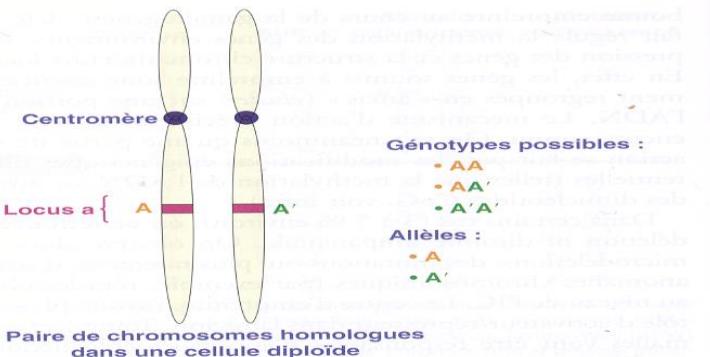


Figure 2.9 Notion d'allèle et de génotype. Le locus a est localisé sur une paire de chromosomes non sexuels (autosomes) dans une cellule diploïde. Ce locus représente une position d'une séquence d'ADN sur le chromosome. De manière générale, elle peut représenter un simple SNP ou une grande région d'ADN (par exemple, le locus HLA). La présence de variants au locus définit des allèles (A et A'). Un allèle peut représenter un variant de gène ou de polymorphisme. Le génotype est l'association au sein du locus des deux allèles d'un même gène (par exemple, AA').

LES
POLYMORPHISMES
DE L'ADN
NUCLEAIRE

LES POLYMORPHISMES BI-ALLELIQUES (SNP)= microlésions

- **>1 million/génome** normal (>STR et plus stable)
- transmission héréditaire stable
- SNP si fréquence dans la population >1%
- Espacés tous les 1.2 à 1.9kpb
- classés selon les conséquences observées ou leur localisation dans le génome:
- changement d'acide aminé (aa) ou pas
- présent dans les régions non-codantes 5' ou 3'
- présent dans d'autres régions du génome (intron, région intergéniques)
- La plupart n'affecte ni la fonction du gène ni celle de la protéine codée par le gène**
- parfois associés à des pathologies (omim ou non)
- si modification de la fonction protéique, on parle de **polymorphisme fonctionnel**
- **Applications (diagnostic maladies génétiques, médecine prédictive, biodiversité humaine,...)**

LES POLYMORPHISMES MULTI-ALLELIQUES (STR)= macrolésions

- Short Tandem Repeat (STR) = **microsatellites** (1-5pb)
- **50 000-100 000 copies/génome**
- espacées tous les 10kpb
- le plus souvent dinucléotidiques [CA/GT]_n
- **3 à 4% du génome** humain
- Le plus souvent dans régions intergéniques mais **parfois également dans régions géniques** (régions non codantes 5' ou 3', exons, intron)
- Sujet à **phénomène d'anticipation** (Cf chapitre MHM) et sont parfois associés à des **pathologies omim** (=maladies génétiques=MHM)
- **Applications (diagnostic maladies génétiques, empreintes génétiques, paternité...)**

AUTRES POLYMORPHISMES

L'EPIGENETIQUE

- l'**épigénétique** est un phénomène physiologique fondamental dans la cellule (ex: **méthylation** des îlots CpG de certains promoteurs, **remodelage chromatinien**) qui intervient dans de nombreuses régulations.

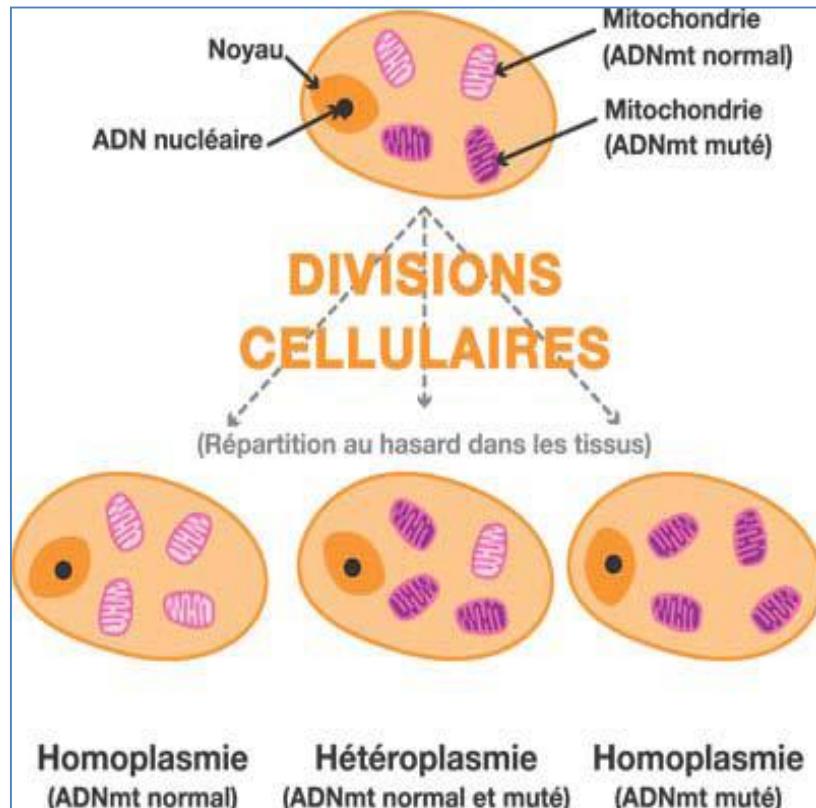
- De manière générale, au niveau des promoteurs notamment, l'**hyperméthylation et la compaction chromatinienne** sont associés à la répression de l'expression des gènes et participent à la **régulation de l'expression du gène**.

EPIMUTATIONS

Les **épimutations** sont aussi observées dans des maladies héréditaires et sont la conséquence de **mutations sur des gènes impliqués dans la méthylation**.

D'autres **mutations sur des gènes impliqués dans le remodelage chromatinien** (histone acétyltransférase, ATPases remodelant les nucléosomes par exemple) peuvent être responsables des conséquences pathologiques de sa dysrégulation (cancers, malformations, retards mentaux par exemples).

AUTRES POLYMORPHISMES



Les mitochondries sont comme des centrales produisant l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule.

Chaque cellule de l'organisme en contient plusieurs centaines, voire plusieurs milliers.

Lorsqu'une majorité de mitochondries est "malade" (mutations dans l'ADNmt), la cellule n'a plus assez d'énergie pour assurer correctement sa fonction. Ces mitochondries "malades" peuvent se trouver dans n'importe quelle cellule de l'organisme : n'importe quel organe peut donc être touché dans les maladies mitochondrielles (cytopathies mitochondrielles ou mitochondriopathies).

Mutations MITOCHONDRIALES

LES POLYMORPHISMES BI-ALLELIQUES

(Exemples de relation SNP/maladie omim ou non)

Tableau 2.1. Exemples de polymorphismes bi-alléliques (SNP) associés à des maladies

Gène	Variant(s)	Pathologie associée
Gène de susceptibilité :		
- apolipoprotéine E	Alièle ε4	Maladie d'Alzheimer
- NRAMP1 (<i>natural resistance associated macrophage protein 1</i>)	Asp543Asn	Tuberculose
- PPARG (<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)	G>C IVS4	
	Pro12Ala	
Pronostic :		
- MBL2 (<i>mannose binding lectin</i>)	Variants structuraux B, C et D	Mucoviscidose
- TNF (<i>tumor necrosis factor</i>)	-376G>A	Neuropaludisme
	-308G>A dans le promoteur	
Pharmacogénétique :		
ADRB2 (<i>β2 adrenergic receptor</i>)	Gly16Arg	Catécholamines (albuterol)
CYP2C9 (<i>cytochrome P450 2C9</i> , polypeptide 9)	Arg144Cys	Dosage de la warfarine

MHM

RELATION SNP/PRISE MEDICAMENTEUSE
(Analyse RFLPcytP450 en TP toxico)

LES POLYMORPHISMES MULTI-ALLELIQUES

(Exemples de relation STR/maladie génétique monogénique (MHM)=omim)

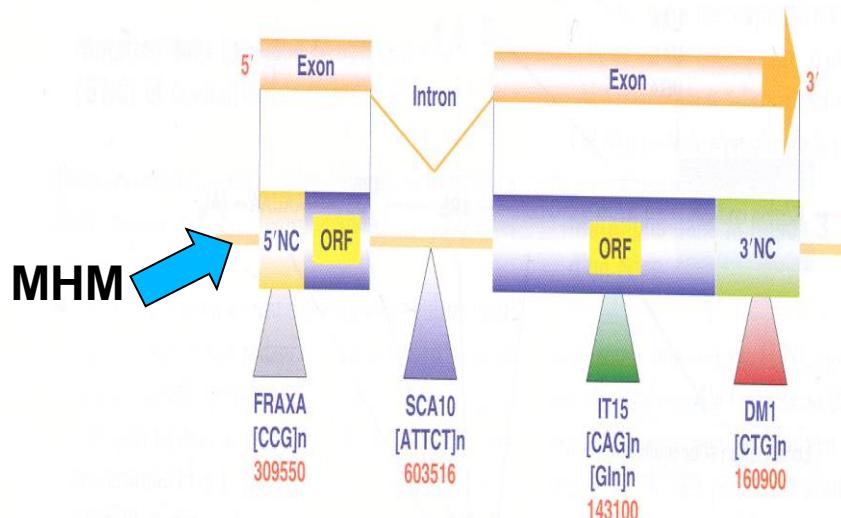


Figure 2.24 Exemples de localisation d'expansion de séquences répétées dans le génome. Le nombre indiqué en dessous de chaque abréviation de gène est le numéro Omim. 5'NC : région 5' non codante ; 3'NC : région 3' non codante ; ORF (open reading frame) : partie codante d'un gène ; FRA-XA (*Fragile site mental retardation 1*) : syndrome de l'X fragile (le gène muté est FMR1) ; IT15 (appelé aussi huntingtine) : gène muté dans la chorée de Huntington ; SCA10 (*spinocerebellar ataxia*) : gène muté dans l'ataxie spinocérébelleuse ; DM1 (*dystrophia myotonica 1*) : gène muté dans la maladie de Steinert (dystrophie myotonique).

Exemple du syndrome *immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies* (ICF, Omim 242860):

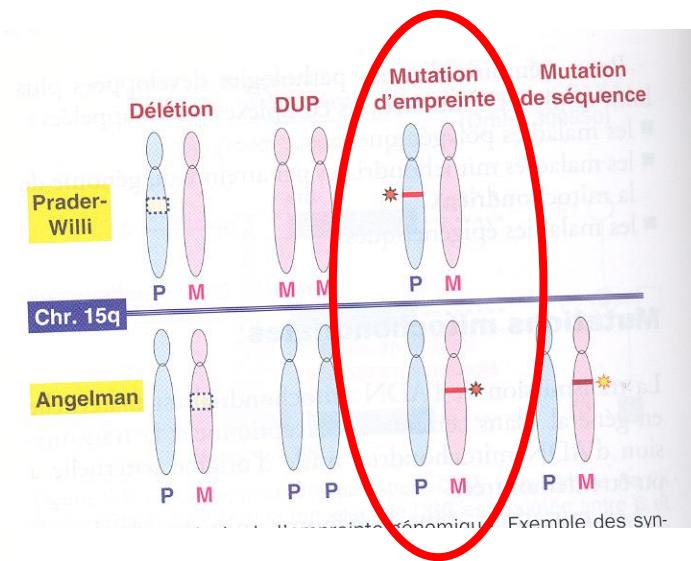
syndrome rare, de transmission autosomique récessif.

caractérisé par un immunodéficit général associé à des anomalies de développement.

Dans les lymphocytes, des anomalies chromosomiques sont observées (hétérochromatine péricentromérique allongée sur le chromosome 1 ou 16 au niveau de régions riches en séquences répétées). **Ces régions sont normalement fortement méthylées.**

Dans le syndrome ICF, elles sont hypométhylées: conséquence d'une mutation sur le gène codant une ADN méthylase (DNMT3B).

La méthylation différentielle de gènes parentaux peut être importante dans le phénomène **d'empreinte génomique** (expression différentielle d'un gène selon son origine maternelle ou paternelle).



Certaines **anomalies de méthylation provoquent un dérèglement de l'empreinte génomique**. C'est le cas par exemple dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS, Omim 130650) responsable d'anomalies du développement et de risque élevé de tumeurs dans l'enfance.

pathologies mitochondrielles

MYOPATHIES MITOCHONDRIALES

Autres appellations : **Syndrome de MELAS** (Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis Stroke), **Syndrome de MERRF** (Myoclonic Epilepsy Ragged Red Fibers),

Les maladies mitochondrielles sont des maladies qui ont en commun des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale.

N'importe quel organe peut donc être touché dans les maladies mitochondrielles. Les myopathies mitochondrielles touchent cependant **plus particulièrement les muscles**. Elles comprennent notamment les syndromes de MELAS et de MERRF.

Ces maladies peuvent être héréditaires. Leur transmission est complexe:

* Les formes liées à une **altération primitive de l'ADN mitochondrial** n'obéissent pas aux lois classiques de l'hérédité mendélienne mais sont **transmises selon les lois de l'hérité dite maternelle**.

* Dans d'autres cas, il peut s'agir **d'anomalies de gènes de l'ADN nucléaire (l'ADN « classique »)** contrôlant indirectement la chaîne respiratoire et se **transmettant sur le mode autosomique dominant**, soit sur le mode autosomique récessif.

La gravité des maladies mitochondrielles est très variable selon les individus. Dans les maladies mitochondrielles dues à une anomalie de l'ADN mitochondrial, l'atteinte d'une cellule (donc d'un tissu, donc d'un organe...) **dépend de la proportion de mitochondries "malades"** qu'elle contient : car dans chaque cellule coexistent des mitochondries normales et des mitochondries malades (cette coexistence se nomme hétéroplasmie). Il existe un effet **seuil**.

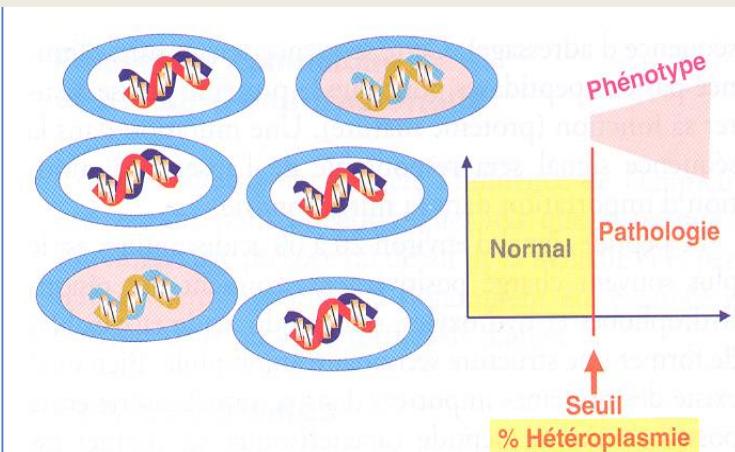


Figure 2.7 Notion d'effet seuil dans la pathologie mitochondriale. La répartition aléatoire entre le nombre de mitochondries normales et pathologiques est variable. Lorsque le nombre de mitochondries pathologiques atteint une certaine quantité (seuil), les phénomènes pathologiques se déclarent notamment dans les tissus dépendant en grande partie du métabolisme mitochondrial (par exemple, le cerveau).

Les maladies héréditaires monogéniques (MHM)

- Recensement de ces maladies regroupé dans le **catalogue Omim** accessible sur Internet (On line Mendelian Inheritance in Man)
- Sont **nombreuses (>4000)** mais rares. Cependant, réel problème humain et de santé publique
- **Les plus fréquentes ont une incidence faible:**
 - mucoviscidose (incidence 1/3000)
 - déficit en alpha 1- antitrypsine (incidence 1/1700)
 - hypercholesterolemie familiale (incidence 1/500)
 - neurofibromatoses (incidence 1/3000)
- **Plusieurs mode de transmission:**
 - transmission héréditaire ***mendélienne***
 - * récessif lié à l'X (Ex: hémophilie A; omim 306700)
 - * dominant lié à l'X (Ex: formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth; omim 302800)
 - * autosomique récessif (Ex: mucoviscidose, omim 219700)
 - * autosomique dominant (Ex: porphyrie aigüe intermittente, omim 176000)
 - * codominant (Ex: groupes sanguins ABO)
 - transmission héréditaire ***non mendélienne*** (phénomène d'anticipation; extension de séquences répétées en nombre anormal; Ex: syndrome de l'X-fragile, omim 309550 ou chorée de Huntington, omim 143100)

Examples of notable Mutations

ΔF508
deletion
in cystic
fibrosis

		2nd base			
		U	C	A	G
3rd base in each row	U	UUU (Phe/F) Phenylalanine	UCU (Ser/S) Serine	UAU (Tyr/Y) Tyrosine	UGU (Cys/C) Cysteine
	U	UUC (Phe/F) Phenylalanine	UCC (Ser/S) Serine	UAC (Tyr/Y) Tyrosine	UGC (Cys/C) Cysteine
	U	UUA (Leu/L) Leucine	UCA (Ser/S) Serine	UAA Ochre (Stop)	UGA Opal (Stop)
	U	UUG (Leu/L) Leucine	UCG (Ser/S) Serine	UAG Amber (Stop)	UGG (Trp/W) Tryptophan
3rd base in each row	C	CUU (Leu/L) Leucine	CCU (Pro/P) Proline	CAU (His/H) Histidine	CGU (Arg/R) Arginine
	C	CUC (Leu/L) Leucine	CCC (Pro/P) Proline	CAC (His/H) Histidine	CGC (Arg/R) Arginine
	C	CUA (Leu/L) Leucine	CCA (Pro/P) Proline	CAA (Gln/Q) Glutamine	CGA (Arg/R) Arginine
	C	CUG (Leu/L) Leucine	CCG (Pro/P) Proline	CAG (Gln/Q) Glutamine	CGG (Arg/R) Arginine
3rd base in each row	A	AUU (Ile/I) Isoleucine	ACU (Thr/T) Threonine	AAU (Asn/N) Asparagine	AGU (Ser/S) Serine
	A	AUC (Ile/I) Isoleucine	ACC (Thr/T) Threonine	AAC (Asn/N) Asparagine	AGC (Ser/S) Serine
	A	AUA (Ile/I) Isoleucine	ACA (Thr/T) Threonine	AAA (Lys/K) Lysine	AGA (Arg/R) Arginine
	A	AUG (Met/M) Methionine	ACG (Thr/T) Threonine	AAG (Lys/K) Lysine	AGG (Arg/R) Arginine
3rd base in each row	G	GUU (Val/V) Valine	GCU (Ala/A) Alanine	GAU (Asp/D) Aspartic acid	GGU (Gly/G) Glycine
	G	GUC (Val/V) Valine	GCC (Ala/A) Alanine	GAC (Asp/D) Aspartic acid	GGC (Gly/G) Glycine
	G	GUA (Val/V) Valine	GCA (Ala/A) Alanine	GAA (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine
	G	GUG (Val/V) Valine	GCG (Ala/A) Alanine	GAG (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine

Selection of notable mutations, ordered in a standard table of the genetic code of amino acids.

Clinically important missense mutations generally change the properties of the coded amino acid residue between being basic, acidic, polar or nonpolar, while nonsense mutations result in a stop codon.

Amino acids

- Basic
- Acidic
- Polar
- Nonpolar (hydrophobic)

Fragile X Syndrome

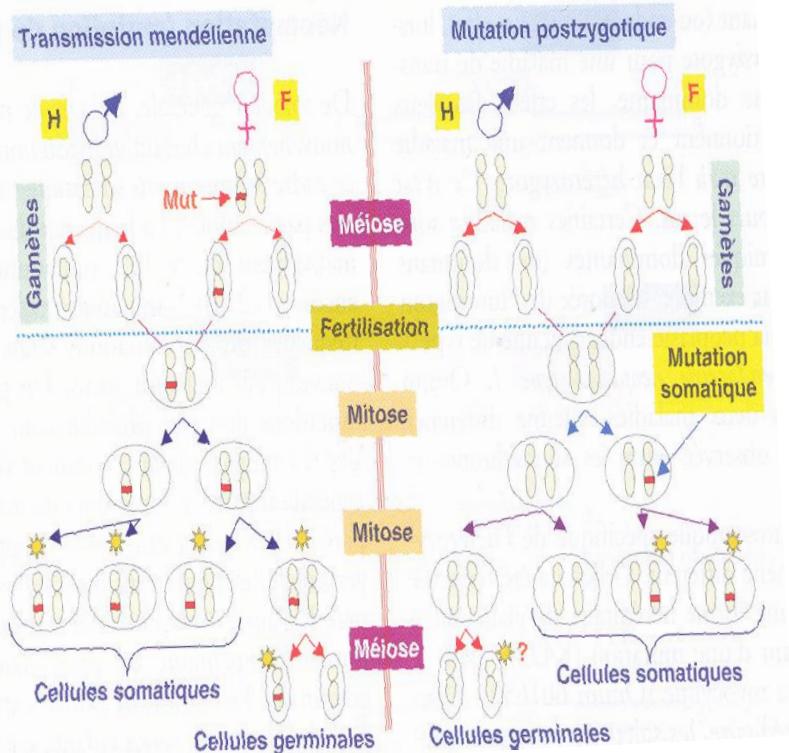
Polyglutamine (PolyQ) Diseases

- Huntington's disease
- Spinocerebellar ataxia (SCA) (most types)
- Spinobulbar muscular atrophy (Kennedy disease)
- Dentatorubral-pallidoluysian atrophy

Mutation type

- = Trinucleotide repeat
- = Deletion
- = Missense
- = Nonsense

La maladie héréditaire (ou maladie génétique) est une maladie qui est transmise par le spermatozoïde ou par l'ovule. Il s'agit d'une affection présente dès le début de la vie intra-utérine. Celles-ci sont le résultat de la présence, au niveau des chromosomes, de gènes anormaux. On parle également de génopathie ou d'hérédopathie. **Les maladies acquises (=non héréditaires) sont des affections apparaissant après la fécondation (=mutations postzygotiques)**, soit pendant la vie intra-utérine (à l'intérieur de l'utérus pendant la grossesse) soit après la naissance. Les premières portent le nom d'embryopathie (maladie de l'embryon) et de foetopathie (maladie du fœtus).



Transmission héréditaire non-mendélienne via phénomène d'anticipation (séquence répétées de type STR).

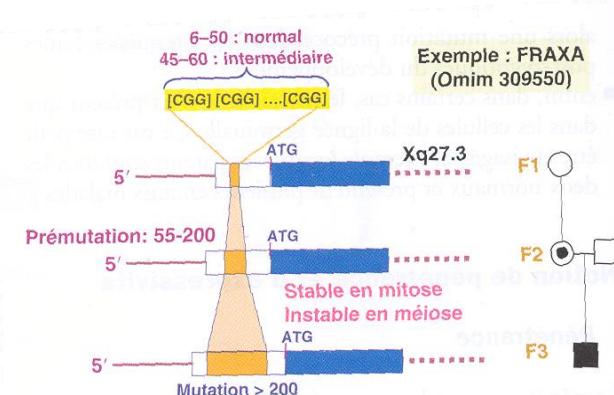


Figure 2.5 Le phénomène d'anticipation. Dans le syndrome de l'X fragile (Omim 309550), la trinucléotide CGG est répétée entre 6 et 50 fois chez le sujet normal. En cas d'anticipation, d'une génération à l'autre, cette répétition de microsatellite augmente. Lorsque le nombre de répétitions du microsatellite est au-dessous du seuil de 200, la maladie n'est pas déclarée encore, c'est le stade de pré-mutation. Au stade de prémutation, il peut y avoir une instabilité de microsatellite aboutissant à une expansion du triplet (phénomène dynamique). Et au-delà d'un certain nombre de répétitions (> 200 en moyenne), la maladie apparaît et s'aggrave au fil des générations, apparaissant de plus en plus précocement : c'est le phénomène d'anticipation.

STR ET PHENOMENE D'ANTICIPATION

- La modification observée se voit sur plusieurs générations. Le plus souvent, elle augmente au cours des générations successives: on parle alors de phénomène d'anticipation.
- A partir d'un certain seuil (nbre de di- ou trinucléotides donné), il y a pathologie.

RELATION GENOTYPE/PHENOTYPE

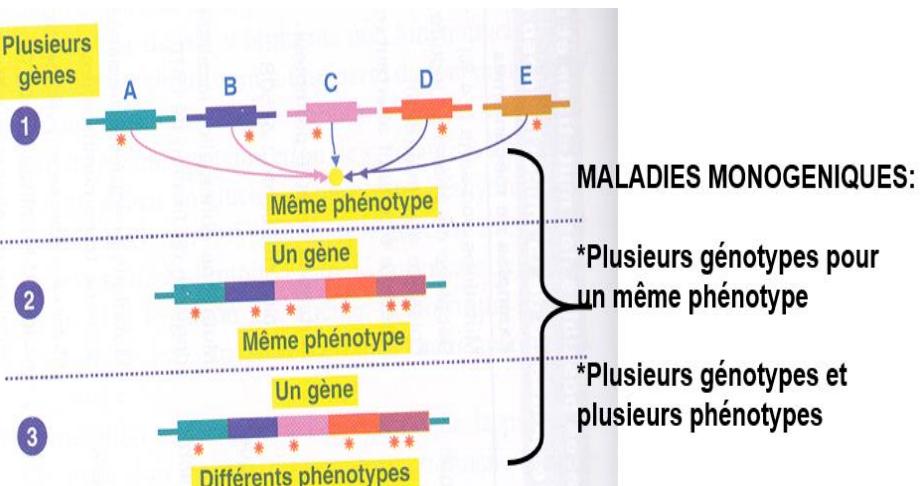


Figure 2.27 Hétérogénéités génotypique et phénotypique. Selon les gènes et les mutations, les conséquences phénotypiques peuvent être différentes. 1. Une même maladie peut être la conséquence de différents gènes : par exemple, syndrome du long QT (Omim 192500, 152427, 603830, 600163, 176261, 600681, 600919, 603796). 2. Plusieurs mutations sur un même gène sont responsables d'une même maladie (par exemple, porphyrine aiguë intermitente, Omim 176000). 3. Selon la localisation de la mutation, la maladie n'est pas la même. Par exemple, les mutations dans le proto-oncogène RET (Omim 164761). Chaque rectangle représente un gène en 1, un exon en 2 et en 3. Chaque étoile représente une mutation différente.

⇒ **La relation génotype/phénotype peut être complexe**

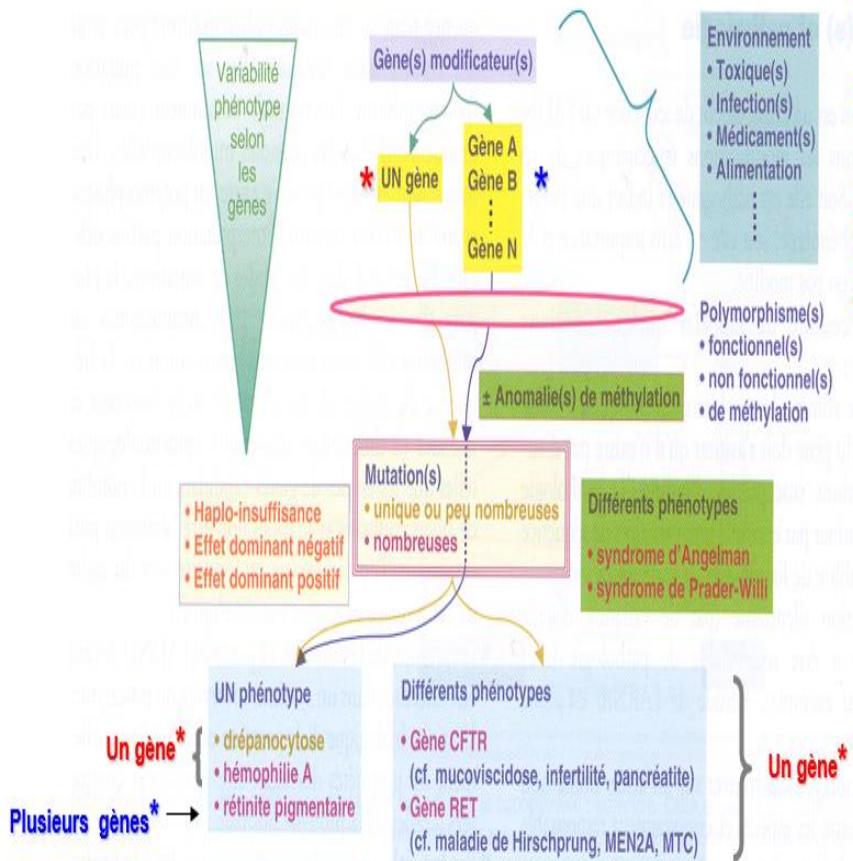


Figure 2.32 Physiopathologie générale en génétique moléculaire. Un ou plusieurs gènes peuvent être impliqués et interagir entre eux. Selon la pathologie, plusieurs possibilités : un gène est atteint et une seule mutation causale (par exemple, la drépanocytose) ; un gène est atteint et de nombreuses mutations sont responsables de la même pathologie (voir hémophilie A) ; plusieurs gènes donnent la même maladie (par exemple, la rétinite pigmentaire) ; un gène selon la localisation de la mutation peut donner différentes maladies. C'est le cas du gène CFTR dont les nombreuses mutations sont essentiellement responsables de la mucoviscidose. Mais certaines mutations peuvent donner une infertilité ou une pancréatite par exemple. Le principe est le même pour le gène RET impliqué dans la maladie de Hirschsprung, le carcinome médiulaire de la thyroïde (MTC) ou dans le syndrome MEN2A (cancer endocrine multiple). Enfin, selon le(s) gène(s) en cause, une relation génotype/phénotype peut ou non exister. La gravité de la maladie peut être variable de modérée à grave (par exemple, pathologie du gène dystrophine responsable de la myopathie de Duchenne et de la maladie de Becker). Des interactions complexes entre l'environnement, des gènes modificateurs et des polymorphismes fonctionnels peuvent moduler l'expressivité de la maladie. Soit celle-ci est absente, soit à des degrés variables le sujet peut être malade. Ces différents facteurs interviennent probablement dans la pénétrance d'une maladie. Enfin, il ne faut pas oublier les anomalies de méthylation responsables de pathologies spécifiques (anomalies d'empreinte génomique) ou participant à des maladies multifactorielles (cancers).

**CM: LES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES
HUMAINES: APPARITION, DIAGNOSTIC ET
APPROCHES THERAPEUTIQUES**

-CHAPITRE 2-

**MECANISMES ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS DELETERES A
L'ORIGINE DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES**

Bernard CARY

**Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Université
Montpellier**

II- MECANISMES ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES

A- MECANISMES GENERANT LES MUTATIONS

- Cas des microlésions
 - Mutations non ponctuelles (petites délétions ou/et insertions)
 - Mutations ponctuelles (faux-sens, silencieuses, non-sens)
- Cas des macrolésions
 - Variation de séquences répétées (mutations de réPLICATION)
 - grandes insertions, duplication, délétions
 - réarrangement génique complexe

B- POSITION DES MUTATIONS SUR UN GENE ET CONSEQUENCES PHENOTYPIQUES

- mutation (microlésions) dans les régions codantes
- mutation (microlésions) perturbant l'épissage
 - dans site accepteur 3'ag ou donneur 5'gt
 - dans site de branchement
 - inactivation ESE
- Mutations (microlésions) dans régions non codantes (5'NC ou 3'NC)
- Créations d'un codon stop prématué (CSP)
- résumé sur les mutations
- Conséquences phénotypiques d'une mutation

Ce sont des substitutions, suppressions ou additions d'un ou de quelques nucléotides

- Petites délétion, insertion et délétion/insertion sont des **mutations non ponctuelles** :

=> **erreurs de réplication** ou de réparation et **réarrangements géniques** peuvent être la cause de mutations non ponctuelles

- Quand une base est substituée en une autre, on parle de **mutation ponctuelle** (SNP). Les SNP (non-sens et faux-sens) sont les plus courantes des mutations rapportées dans la littérature (environ **57%**).

=> De nombreux **mécanismes** sont responsables des mutations ponctuelles :

- la **dépurination**
- la **désamination** notamment des cytosines méthylées (metC en T)
- **erreurs de réplication** ou de réparation (**cause de mutations non ponctuelles également**)
- **transition**: changement d'une base purique (ou pyrimidique) en une autre (G en A ou C en T)
- **transversion**: changement d'une base purique en pyrimidique (G en T) (ou réciproquement par exemple C en A)

⇒ Ce sont des mécanismes de réarrangements géniques complexes dont la taille peut aller de **quelques kpb à plusieurs Mpb.**

- Cas des macrolésions de type grande insertion, duplication, inversion, Délétion, translocation

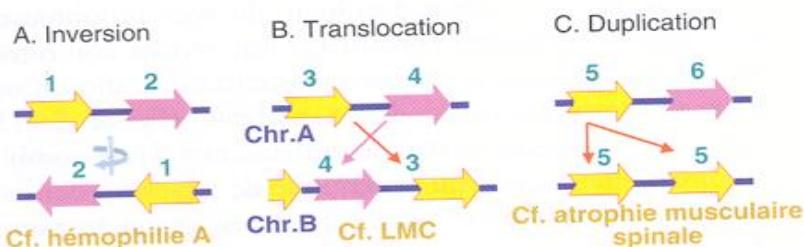
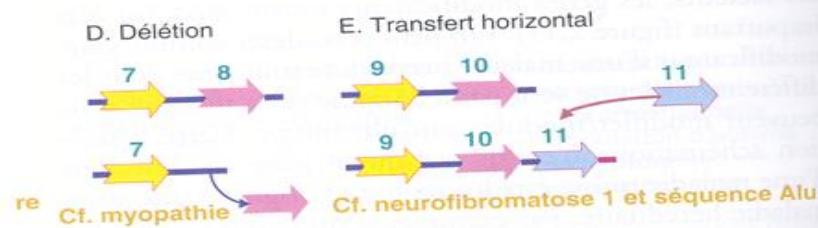


Figure 2.12 Réarrangements géniques -Exemples.



- les réarrangements peuvent être **inter- ou intrachromosomiques** (inter ou intrachromatides)

- via **mécanismes de recombinaisons (homologue ou non):**

- * au sein de famille de gènes regroupés en groupe (cluster)
- * au sein de séquences répétées

- Cas des macrolésions de type STR

- Mutations STR: **mutations de réplication ou dynamiques (n'importe où dans gène)**

- Ce sont en général des erreurs de réplication mitotique ou préméiotique.

- Elles résultent d'un **dérapage (slipped strand mispairing)** dans certaines **zones instables du génome** (comme les zones répétées).

- Elles provoquent une **amplification** (mutation dynamique) ou une **réduction** des **zones répétées**.

- La modification observée se voit sur plusieurs générations. Le plus souvent, elle augmente au cours des générations successives: on parle alors de **phénomène d'anticipation**.

- Ce mécanisme est retrouvé dans des maladies génétiques au cours desquelles le phénomène d'anticipation observé est le résultat de l'instabilité de la répétition de tri nucléotides ou de di nucléotides (STR=microsatellites)

- A partir d'un certain **seuil** (nbre de tri nucléotides donné), il y a **pathologie**.

B- POSITION ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS SUR UN GENE

-En pathologie moléculaire, **une mutation peut être localisée en n'importe quel point d'un gène:**

- mutation (microlésions) dans les régions codantes
- mutation (microlésions) perturbant l'épissage:
 - * dans région codante (inactivation ESE/création SCE)
 - * dans site accepteur 3'ag (ou donneur 5'gt) ou de branchement
- Mutations (microlésions) dans régions non codantes (5'NC ou 3'NC)

=> **Les conséquences de ces mutations** selon leur localisation **sont variables**

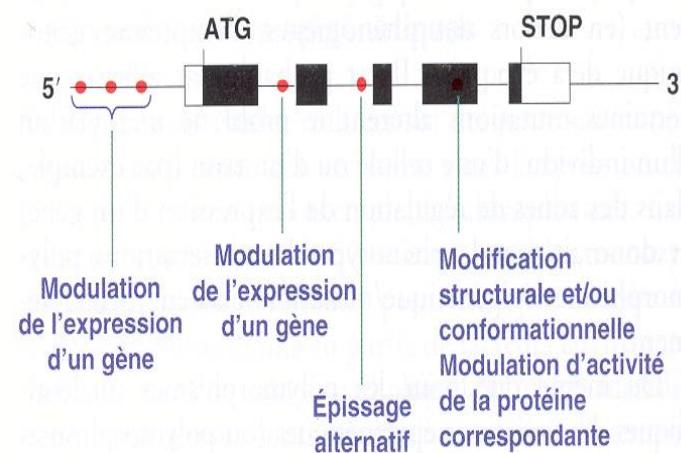
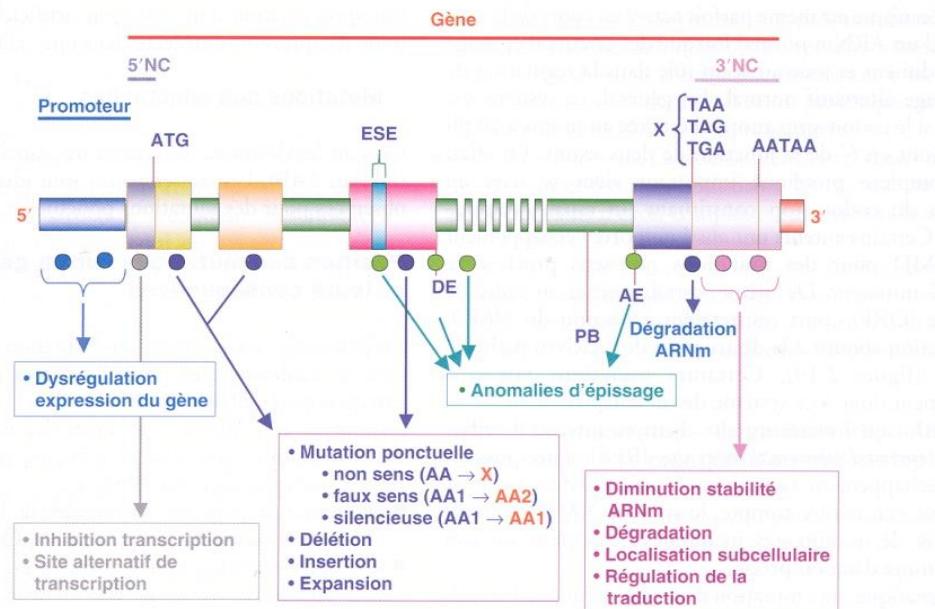


Figure 2.10 Conséquences fonctionnelles et/ou structurales potentielles des polymorphismes fonctionnels.

-Mutations ponctuelles:

- mutations faux-sens

- *induisent un changement d'AA sur la protéine
- *conséquence sur le **fonctionnement de la protéine** est variable
- *dans certains cas peut induire une **anomalie d'épissage** (saut d'exon par abolition fonctionnelle d'un site ESE ou modification structure 2aire ARNm)

-mutations silencieuses

- *modifie le codon mais pas l'AA
- *pas de conséquence sur la protéine
- *Cependant peuvent être responsables d'un **épissage anormal** de l'exon (saut d'exons si mutation située sur site favorisant [ESE] ou inhibant [ESS] l'épissage).

-mutations non-sens

- *aboutissent à la formation d'un codon stop (UAA, UAG ou UGA)
- *responsables :

- d'une **protéine tronquée** (le + souvent non fonctionnelle)

- de la **dégradation de l'ARNm**

correspondant (et donc absence de synthèse de la protéine anormale)

- dans certains cas **d'épissage anormal** d'exon (« saut d'exon »)

-Mutations non ponctuelles :

- L'insertion ou la délétion d'une ou plusieurs bases dans la région codante :

- *peut **décaler le cadre de lecture ouvert** (open reading frame=orf).

- *provoque l'apparition d'un codon stop prématué plusieurs bases (une dizaine à une centaine en général) en aval de la mutation.

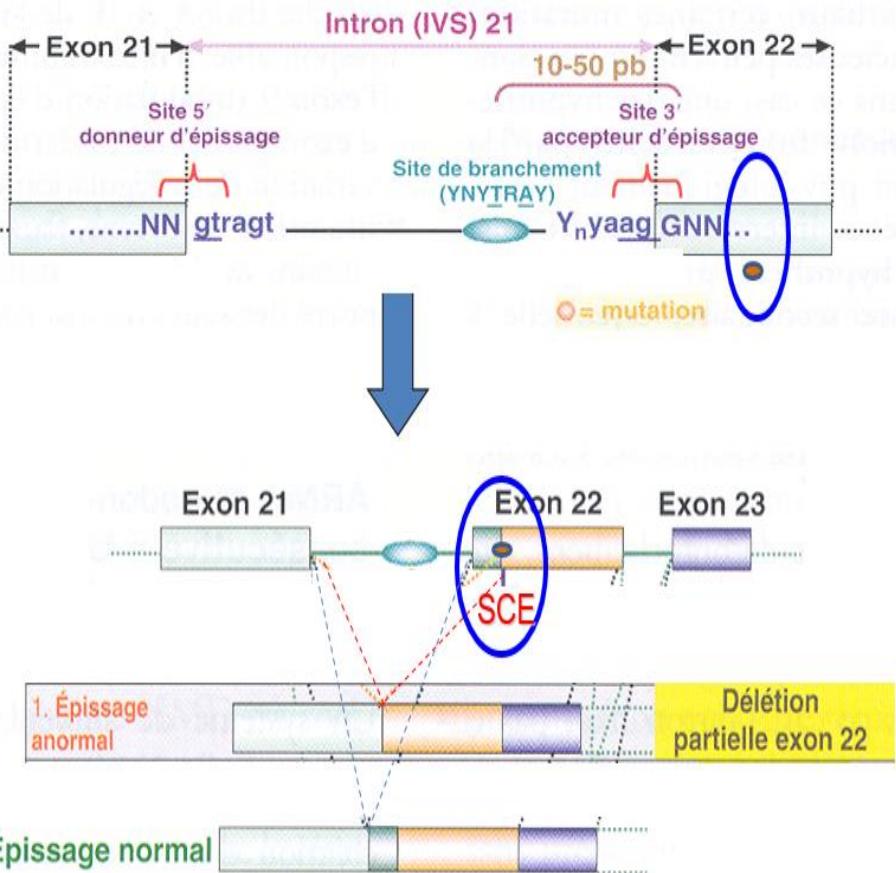
Principales **conséquences**:

- *formation **protéine tronquée** (plus petite)

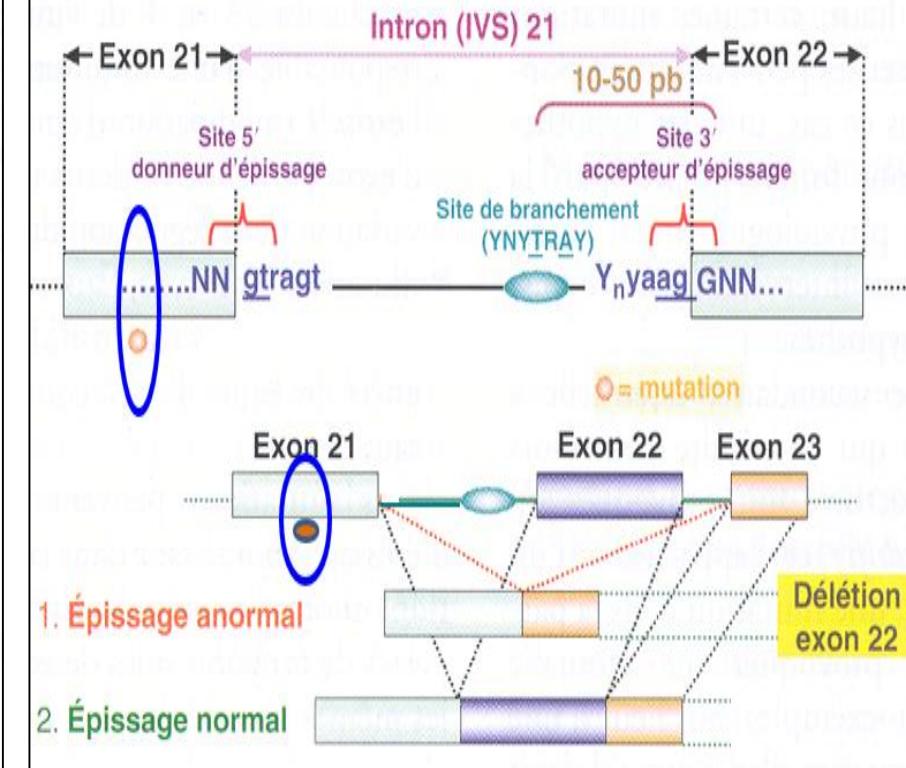
- ***dégradation de l'ARNm** correspondant

=> dans région codante (exon)

* Création d'un site cryptique d'épissage (SCE):



* Inactivation ESE (Exonic Splicing Enhancer):

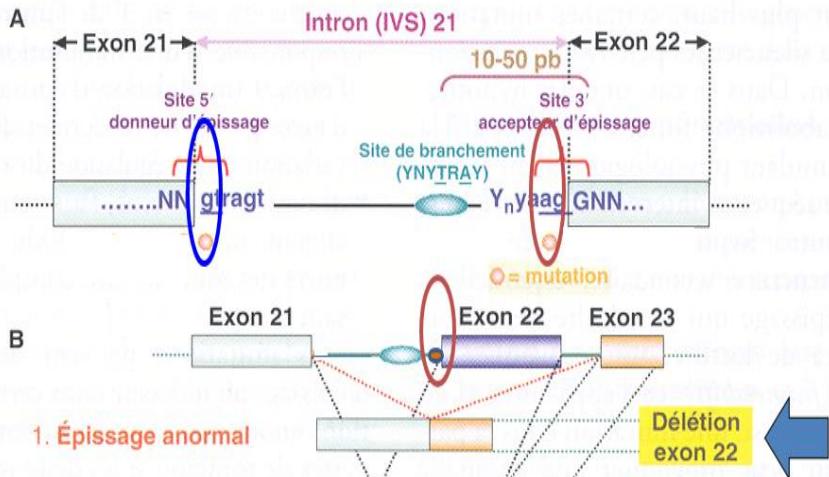


l'épissage anormal raccourcit l'exon 22

=> On obtient une protéine tronquée dans les 2 cas

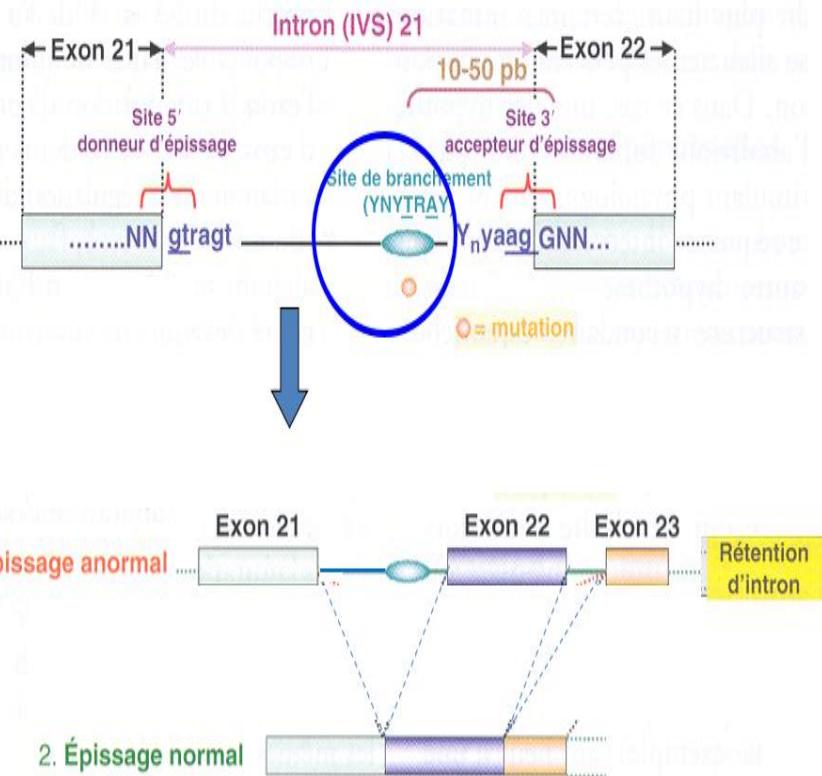
l'épissage anormal délète l'exon 22

⇒ dans site accepteur 3'ag (ou donneur 5'gt):

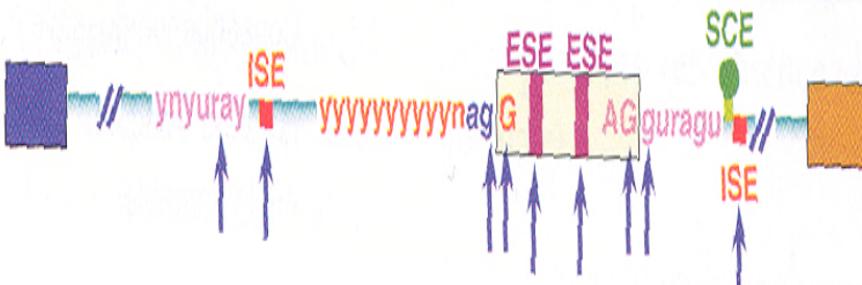


- sont les plus fréquemment mutés
- induit **saut d'exon** (exon skipping; déletion de l'exon)
- cause la plus fréquente (60%) de saut d'exon
- mutation au niveau du site donneur 5' sont plus fréquentes qu'au site accepteur 3' (62 versus 26%)
- la mutation peut perturber (non ponctuelle; frame-shift) ou pas (ponctuelle) le cadre de lecture ouvert.
- on obtient une **protéine tronquée**
- **REMARQUE:** Un saut d'exon n'a pas toujours de conséquence pathologique (épissage alternatif normal)

⇒ dans site branchement:



- Peut entraîner l'absence d'épissage (**rétention d'intron**):
- * ARNm plus grand ou peut devenir instable et donc dégradé



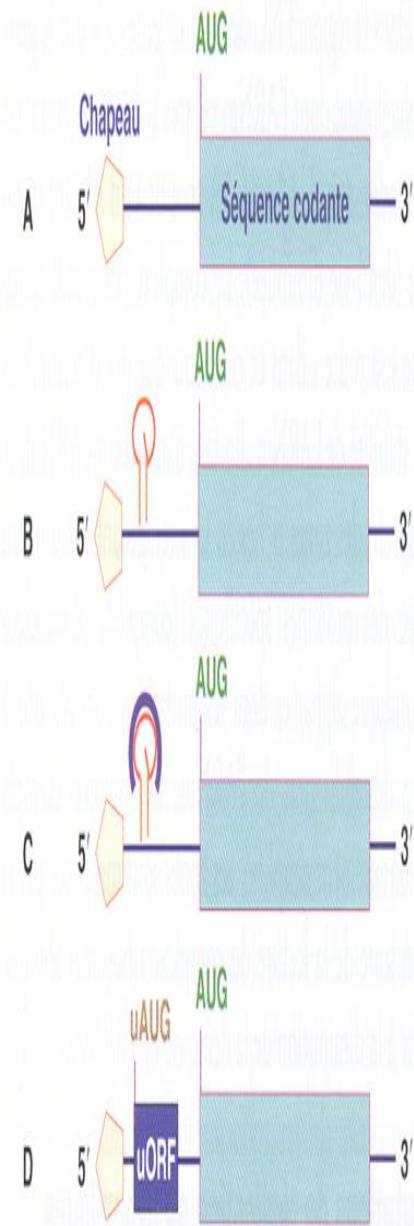
- Sont le plus souvent des mutations ponctuelles
- Représentent 10-15% des anomalies responsables de maladies génétiques.
- Responsables (**conséquences**) de saut (délétion) d'exon, de rétention d'intron ou de création (et activation) d'un site cryptique (atypique) d'épissage (SCE) dans un intron (une portion d'intron sera retrouvée sur le transcrit mature) ou un exon (l'épissage abnormal raccourcira l'exon).
- Le plus souvent, aboutissent à la formation d'un codon stop prématûr (**protéine tronquée**) et à la **dégradation de l'ARNm** par nonsense mediated mRNA decay (NMD).

EXEMPLES D' ANOMALIE D'EPISSAGE INDUISANT UNE PATHOLOGIE

- La mutation 1592+5G>A dans l'intron 10 du gène codant pour **le récepteur au LDL (RLDL)** responsable d'une hypercholestérolémie familiale ([Ommim 143890](#)) induit :
 - le saut de l'exon 10
 - et la création d'un site cryptique d'épissage**=> Responsables d'un ARNm anormal provoquant la pathologie**

- Sur **le gène CFTR**, il existe un polymorphisme du nombre de poly-pyrimidines [T] (T5,T7,T9) au niveau de l'intron 8 (IVS8) proche du site Acceiteur en 3' de l'intron (Y(n)). Ce polymorphisme est responsable d'une diminution de l'épissage normal de l'exon 9 (**modulation d'épissage**), aboutissant à un saut partiel de ce dernier.

Rappels sur Régulations négatives de la traduction



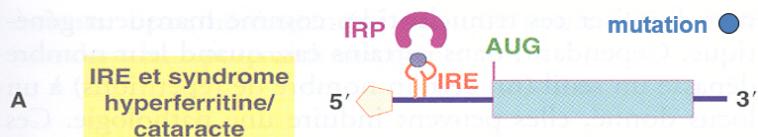
A- ARNm sans régulation négative

B/C- Régulation négative par séquence en boucle (hairpin). Cette boucle interfère dans l'assemblage du complexe de pré-initiation et/ou la recherche du codon AUG par le ribosome (scanning ribosomal). Elle peut être suffisamment stable pour empêcher l'activité de déroulement de l'hélicase et inhiber le scanning ribosomal.

C- Cette boucle peut être stabilisée par des protéines sur certains ARNm.

D- Régulation négative par codon AUG alternatifs (uAUG). Ces uAUG (upstream AUG) répriment ou limitent la traduction de l'AUG physiologique.

Exemple1: interférence sur la régulation négative de la traduction via hairpin



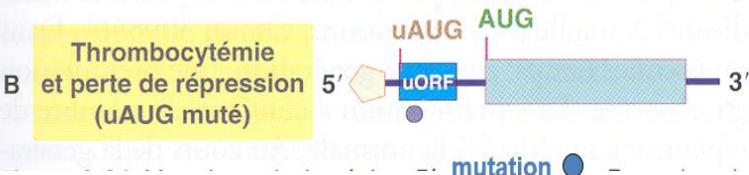
Certains ARNm présentent en 5'NC des séquences régulatrices en boucle qui permettent la régulation de leur traduction après fixation de protéines.

C'est le cas des ferritines H et L qui contiennent des séquences IRE (Iron Responsive Element). Sur ces IRE se fixent des IRP (Iron Regulatory Protein).

Ce mécanisme intervient dans la régulation du métabolisme du fer. La fixation des IRP sur les IRE des ferritines H et L en cas de déplétion en fer aboutit à l'inhibition de leur traduction.

Une mutation (ou délétion) sur cette IRE aboutit à la perte de régulation de la traduction par ce mécanisme et à une hyperferritinémie (**syndrome hyperferritinémie/cataracte, Omim 600886**).

Exemple2: interférence sur la régulation négative de la traduction via uAUG



Certains ARNm présentent en 5'NC des uAUG (upstream AUG) réprimant ou limitant la traduction de l'AUG physiologique (site d'initiation de la traduction).

C'est le cas pour la thrombopoïétine (TPO) qui présente plusieurs uAUG.

Dans certains cas, la **thrombocytémie héréditaire (Omim 187950)**, liée à une surproduction de TPO, est la conséquence d'une mutation sur un uAUG aboutissant à l'augmentation de synthèse de la TPO par perte de répression de la traduction de l'AUG physiologique.

Exemple de la dystrophie myotonique de Steinert (Omim 160900)

-Transmission autosomique dominant

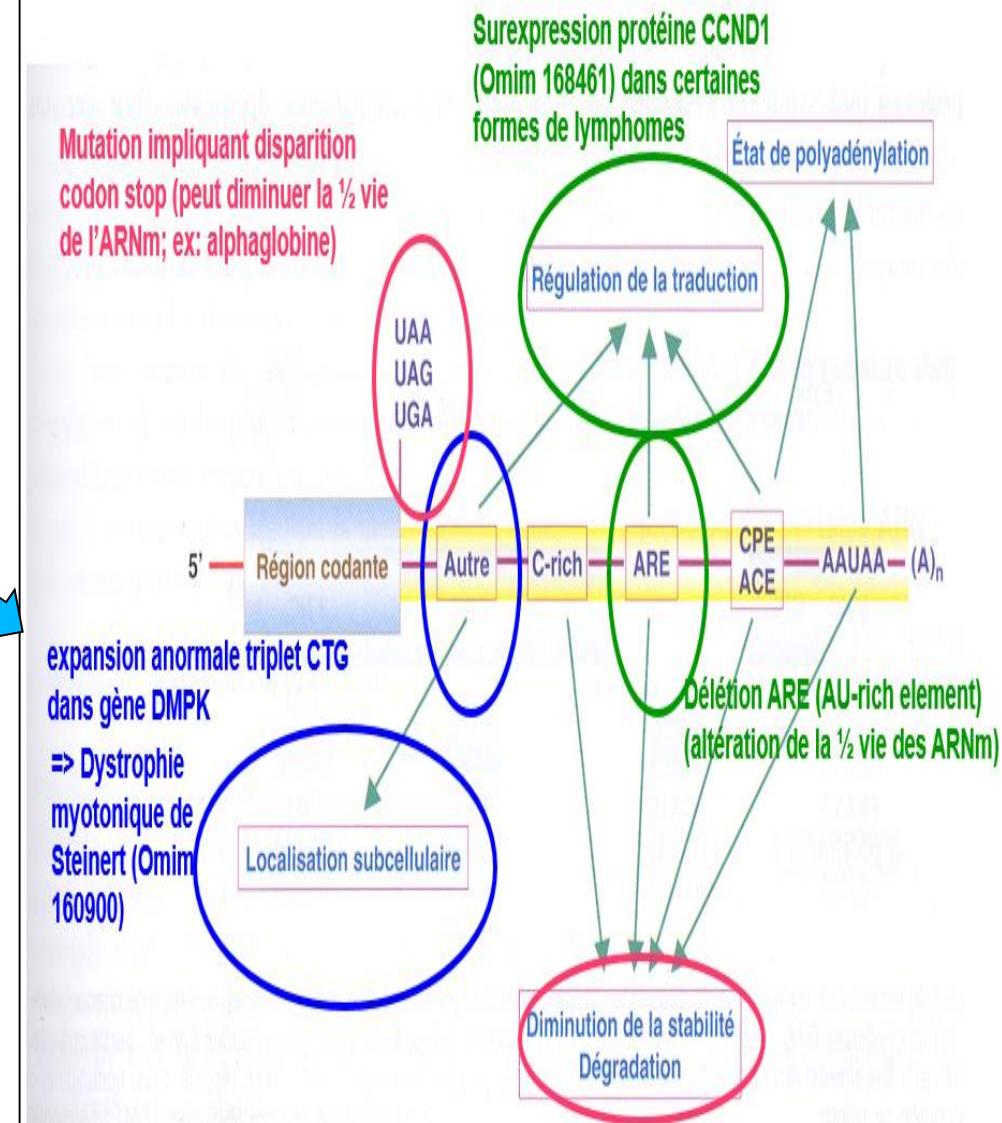
-Conséquence d'une expansion anormalement élevée du triplet CTG en 3'NC du gène DMPK (dystrophia myotonica protein kinase)= **mutation de réplication ou dynamique** (voir chapitre macrolésion).

-En condition normale (5-30 triplet en 3'NC du gène DMPK), une protéine se fixe sur les triplets de l'ARNm pour réguler l'expression et la localisation cellulaire de la protéine.

-chez sujet malade jusqu'à 1000 triplets.

=> Hypothèse sur la conséquence: Il en résulterait une modification de structure de l'ARNm qui induirait une **effet négatif** sur l'expression de la protéine DMPK et **sur son exportation hors du noyau**.

Une mutation (micro- ou macrolésion) dans cette région peut modifier l'expression des gènes via différents phénomènes:



RESUME des mutations induisant la création d'un codon stop prématûré (CSP):

Nombreux mécanismes génèrent l'apparition d'un CSP:

- mutations ponctuelles ~~faux sens~~ **Non-sens**
- décalage du cadre de lecture
- réarrangement génique (macrolésions)
- épissage anormal (réception d'intron, saut d'exon, activation site cryptique d'épissage)
- erreur de réplication, de transcription
- utilisation de sites d'initiation mineurs de la traduction (uAUG)

Un codon stop anormal peut amener à la formation d'une protéine (tronquée) non fonctionnelle ou aux conséquences délétères

-Le système de surveillance NMD permet de dégrader ces ARNm anormaux



DEGRADATION ARNm instable par NMD

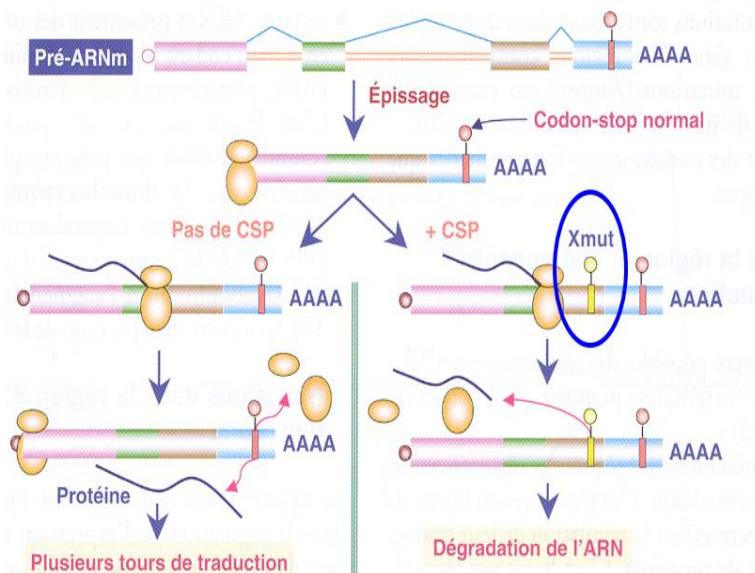


Figure 2.19 Dégradation de l'ARNm par l'intermédiaire d'un codon-stop (nonsense-mediated mRNA decay, NMD). Une mutation, de quelque nature qu'elle soit, responsable de la formation d'un codon-stop prématûré, peut aboutir à la dégradation de l'ARNm. Au cours de la traduction, un certain nombre de complexes protéiques jouent un rôle déterminant en présence des ribosomes (comme le complexe exon-junction complex [EJC] et les protéines up-frame-shift suppressor proteins [UPF]). Lors de la rencontre d'un codon-stop prématûré (CSP), le ribosome ne peut déplacer certains complexes tels que EJC provoquant alors la dégradation de l'ARNm. Ce mécanisme évite la formation de protéines tronquées non fonctionnelles.

RESUME CONSEQUENCES FONCTIONNELLES (sur la protéine) DES MUTATIONS

- Une mutation est le plus souvent responsable :

- * d'une anomalie de synthèse protéique (diminution/absence)
- * d'une modification structurelle (protéine instable)
- * d'une anomalie de ciblage (membrane, organelle)
- * d'une protéine non (ou peu) fonctionnelle (Si la mutation induit des modifications mineures au niveau de la protéine, on peut s'attendre à des conséquences modérées. C'est ce que l'on peut observer dans le cas de certaines microlésions [faux-sens, petites délétions ou insertions])

=> Les mutations en cause sont essentiellement:

- * mutations non-sens (apparition d'un codon stop prématué)
- * mutations faux-sens (changement d'AA)
- * celles qui induisent décalage du cadre de lecture (frame-shift)
- * celles qui induisent une anomalie d'épissage (splicing defect)
- * celles qui induisent une délétion ou une insertion de grande taille
(Note: Une mutation épigénétique (épimutation) peut également induire une modification de la chromatine ou de l'état de méthylation d'un gène et donc avoir une conséquence sur l'expression du gène).

-Quand une microlésion (ponctuelle ou non) est responsable d'une modification de la fonction protéique, on parle de **polymorphisme fonctionnel**

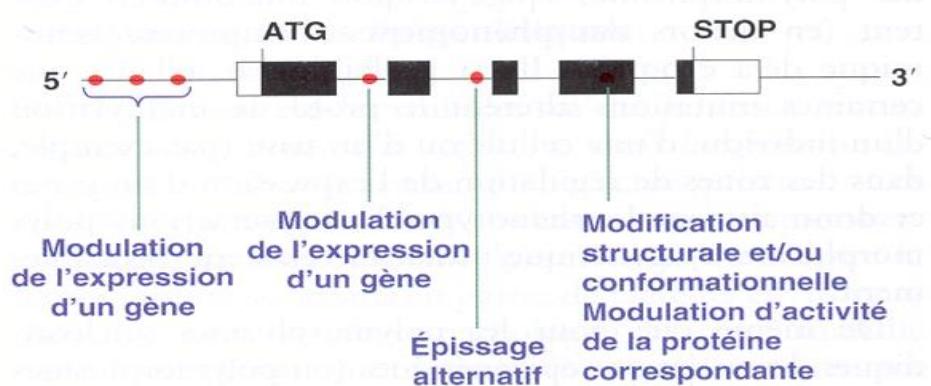


Figure 2.10 Conséquences fonctionnelles et/ou structurales potentielles des polymorphismes fonctionnels.

2 grandes classes:

- ceux modulant l'expression d'un (ou de plusieurs) gènes
- Ceux modifiant la structure (et modulant la fonction) d'une protéine

RESUME CONSEQUENCES DU NOMBRE DE MUTATIONS SUR LE PHENOTYPE DES MHM

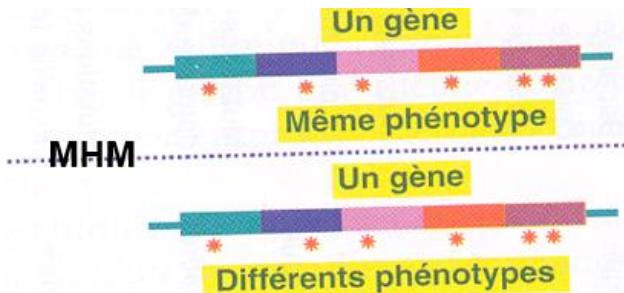
Selon les pathologies, **plusieurs cas de figures** sont possibles.

- **une mutation** peut être responsable de la quasi-totalités des cas (ex: drépanocytose, Omim 693903)

- le **nombre de mutations** identifiées est très **important**:

* **sans prédominance** pour telle ou telle mutation. Il n'y a pas de point chaud (*hotspot*) de mutation. Même phénotype (ex: porphirie aigüe intermitente, Omim 176000)

* **avec prédominance** d'une mutation sur les autres. Il y a un point chaud de mutation: **phénotype variable** (ex: mucoviscidose; sur les >1200 mutations répertoriées, la mutation F508del représente 70% des cas; Omim 219700)



RESUME DES CONSEQUENCES PHENOTYPIQUES DES MUTATIONS

L'effet phénotypique d'une mutation **sur la fonction d'un gène** est variable:

- Aucune conséquence

Il s'agit d'une mutation sans conséquences (variant **allélique**, **polymorphisme non fonctionnel**).

- **Perte de fonction** (*loss of function*) par diminution/abolition de l'activité fonctionnelle d'une protéine et/ou de sa quantité (Ex: un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase [G6PD, Omim 305900] dont le gène est situé sur le chromosome X diminue l'activité enzymatique et provoque chez le garçon une anémie hémolytique lorsqu'il est exposé à certains médicaments ou aliments.

- Agrégation de la protéine (On parle de **mutation conformationnelle**)

- Ex: certaines formes du déficit en alpha-1-antitrypsine (Omim 107400) provoquant l'agrégation Intrahépatocytaire d'alpha-1-antitrypsine muté (mutant Z[E342K] homozygote) et le développement possible d'une cyrrhose.

- Dégradation de la protéine

Dans d'autres pathologies, les anomalies **conformationnelles** de la protéine peuvent aboutir à sa dégradation (par exemple la protéine CFTR [mutation F508del])

- renforcement de la fonction (*gain of function*) de la protéine mutée

- apport d'effet toxique

Exemple dans la maladie de Huntington (Omim 143100). La huntingtine mutée (résultant d'une expansion anormale de triplet CAG codant pour la glutamine) séquestre la huntingtine normale et provoque sa précipitation et des effets toxiques sur les neurones.

-Apparition d'une nouvelle fonction de la protéine mutée par modification de sa propriété.

Exemple de la protéine DMT1/DCT1/Nramp2 (Omim 600523), molécule impliquée dans le transport transmembranaire du Fe²⁺ au niveau de l'intestin proximal. Chez la souris, une mutation (G185R) dans le gène codant pour cette protéine induit une fonction de canal Ca²⁺ chez la protéine mutée. Il en résulte carence en fer et anémie.

L'effet phénotypique d'une mutation peut être **modulé** :

-par l'existence d'un variant allélique (= association de mutations).

Exemple dans pathologie liée au CFTR (Omim 602421):

- la **mutation R117H** associée au **variant allélique 5T** (séquence poly[T] localisée au niveau du site accepteur [Y(n)] de l'intron 8) est associée à une **mucoviscidose sans insuffisance pancréatique**

- la **même mutation** associée au **variant allélique 7T** est responsable d'une **infertilité masculine** uniquement.

RESUME PATHOLOGIES INDUITES

Examples of notable
Mutations

		2nd base			
		U	C	A	G
1st base 3rd base in each row	U	UUU (Phe/F) Phenylalanine UUC (Phe/F) Phenylalanine UUA (Leu/L) Leucine UUG (Leu/L) Leucine	UCU (Ser/S) Serine UCC (Ser/S) Serine UCA (Ser/S) Serine UCG (Ser/S) Serine	UAU (Tyr/Y) Tyrosine UAC (Tyr/Y) Tyrosine UAA Ochre (Stop) UAG Amber (Stop)	UGU (Cys/C) Cysteine UGC (Cys/C) Cysteine UGA Opal (Stop) UGG (Trp/W) Tryptophan
	C	CUU (Leu/L) Leucine CUC (Leu/L) Leucine CUA (Leu/L) Leucine CUG (Leu/L) Leucine	CCU (Pro/P) Proline CCC (Pro/P) Proline CCA (Pro/P) Proline CCG (Pro/P) Proline	CAU (His/H) Histidine CAC (His/H) Histidine CAA (Gln/Q) Glutamine CAG (Gln/Q) Glutamine	CGU (Arg/R) Arginine CGC (Arg/R) Arginine CGA (Arg/R) Arginine CGG (Arg/R) Arginine
	A	AUU (Ile/I) Isoleucine AUC (Ile/I) Isoleucine AUA (Ile/I) Isoleucine AUG (Met/M) Methionine	ACU (Thr/T) Threonine ACC (Thr/T) Threonine ACA (Thr/T) Threonine ACG (Thr/T) Threonine	AAU (Asn/N) Asparagine AAC (Asn/N) Asparagine AAA (Lys/K) Lysine AAG (Lys/K) Lysine	AGU (Ser/S) Serine AGC (Ser/S) Serine AGA (Arg/R) Arginine AGG (Arg/R) Arginine
	G	GUU (Val/V) Valine GUC (Val/V) Valine GUA (Val/V) Valine GUG (Val/V) Valine	GCU (Ala/A) Alanine GCC (Ala/A) Alanine GCA (Ala/A) Alanine GCG (Ala/A) Alanine	GAU (Asp/D) Aspartic acid GAC (Asp/D) Aspartic acid GAA (Glu/E) Glutamic acid GAG (Glu/E) Glutamic acid	GGU (Gly/G) Glycine GGC (Gly/G) Glycine GGA (Gly/G) Glycine GGG (Gly/G) Glycine

Selection of notable mutations, ordered in a standard table of the genetic code of amino acids.

Clinically important missense mutations generally change the properties of the coded amino acid residue between being basic, acidic, polar or nonpolar, while nonsense mutations result in a stop codon.

Amino acids

- Basic
- Acidic
- Polar
- Nonpolar (hydrophobic)

Fragile X Syndrome

Polyglutamine (PolyQ) Diseases

- Huntington's disease
- Spinocerebellar ataxia (SCA) (most types)
- Spinobulbar muscular atrophy (Kennedy disease)
- Dentatorubral-pallidolysian atrophy

Mutation type

- = Trinucleotide repeat
- = Deletion
- = Missense
- = Nonsense

Friedreich's ataxia

β-Thalassemia

β-Thalassemia

McArdle's disease

Prostate cancer

Sickle-cell disease

I- POLYMORPHISMES DU GENOME HUMAIN ET PATHOLOGIE MOLECULAIRE (MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES)

II- MECANISMES ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES

III- METHODES D'IDENTIFICATION DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES GENETIQUES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE)

A- METHODES DE BASE

- Notions d'hybridation moléculaire (Tm, sondes, amorces nucléotidiques)
- Le Southern blot
- L'amplification génique par PCR (classique et en temps réel)
- Le séquençage enzymatique d'un ADN (Sanger & Coulson)

B- APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC

- Le diagnostic génotypique
- détection SNP par séquençage
- Détection RFLP ou STR/VNTR par Southern blot ou PCR
- autres méthodes de diagnostic dérivées de la PCR (SSCP, DGGE, HRM, DHPLC, MLPA) et du séquençage (pyroséquençage et SMRT) ((UE optionnelle Maladies Héréditaires du Métabolisme)

(C- AUTRES APPLICATIONS)

- Organisation génomique d'un gène dans un génome (par Southern blot)
- Détection d'un gène dans une banque (par Southern ou PCR)
- Tests génétiques grand public et médecine prédictive (séquençage)

IV- APPROCHES THERAPEUTIQUES DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (TRANSFERT DE GENE)

A- LE CLONAGE MOLECULAIRE D'UN ADN D'INTERET SUR UN VECTEUR

- Extraction des acides nucléiques (ADN, ARNm, synthèse d'ADNc)
- Séparations électrophorétiques (classique ou PFGE) de l'ADN et visualisation
- Ligature de 2 ADN (dans une stratégie de clonage d'un ADN d'intérêt sur un vecteur)
- Vecteurs de clonage (plasmides, BAC, rétrovirus)
- Transformation bactérienne
- Sélection colorimétrique de bactéries contenant un vecteur recombinant (α -complémentation)
- Banque d'ADN

B- APPLICATIONS THERAPEUTIQUES LIEES AU TRANSFERT DE GENE

- Production de protéines thérapeutiques recombinantes
 - par des bactéries en fermenteur (tag (His)6 ou GST)
 - par des animaux ou végétaux transgéniques
- Thérapie génique (ADN médicament)
 - les différentes stratégies (in vivo ou ex vivo)
 - les vecteurs viraux
 - les vecteurs non viraux
- Le clonage reproductif et thérapeutique
- Modifications du génome via approche CRISPR-Cas9

Méthodes d' analyse du génome et d'identification des mutations/polymorphismes

Entre les années 1970 et 90 :

- développement des **techniques** (Southern blot, séquençage via ddNTP, PCR) **et outils** (extraction ADN et séparation electrophorétique, Enzyme de restriction, vecteur, clonage moléculaire) **de base de Biologie moléculaire** permettant l'analyse et l'étude de l'ADN humain
- Manipulation principalement à l'échelle du gène

Depuis les années 90 :

-**Évolution des techniques et outils de base** (qPCR, HRM, pyroséquençage, clonage d'organismes, CRISPR-Cas, etc)

-manipulation à l'échelle du gène et du génome

Nombreuses applications médicales et pharmaceutiques (entre autres)

Techniques de base de la Biologie Moléculaire

Tech.
BM2

Clonage

Tech. BM1

Séquence

PCR

GENES COMPLEXES

GÈNES

Clonage dans YAC

Cartographie génétique

Cartographie par saut

CHROMOSOMES

Hybridation in situ
Cartographie physique

GÉNOME HUMAIN

1 10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷ 10⁸ 10⁹ pdb

POUVOIR RESOLUTIF DES DIFFERENTES METHODES D'EXPLORATION DES GENES ET DU GENOME

→ Taille des fragments d'ADN étudiés: jusqu'à 10⁵ pb

TECHNIQUE DE BASE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE I (Appliquées à l'identification, l'amplification et le séquençage d'un gène ou d'un génome)

= DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE

1- PCR

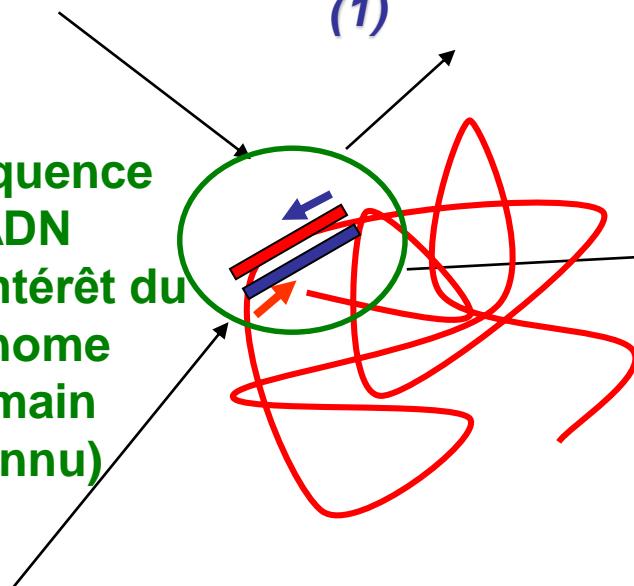
*Ciblage du gène par 2 amores ADN
Simple brin*

→ ET ←

Identification d'un gène dans le génome (1, 2 et 3)

Amplification du gène dans un génome sans fragmentation du génome (1)

Séquence d'ADN d'intérêt du génome humain (connu)



3- Southern blot

Ciblage du gène par une sonde (ADN double brin ou simple brin)

2- séquençage

Ciblage du gène par 1 amorce ADN simple brin

→ O ← U

→

ATCGATCA....

←

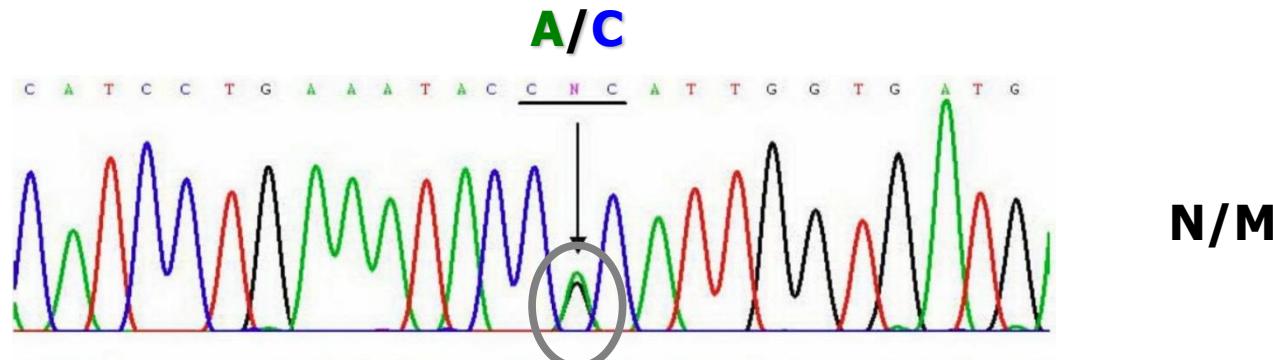
CGGACTAA....

Séquençage= Détermination de l'agencement précis des bases A,C,G et T dans l'ADN d'intérêt

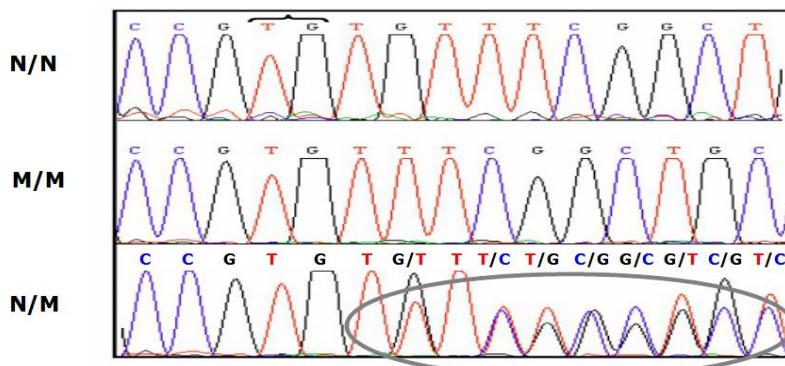
La découverte des techniques/outils de biologie moléculaire I (tels que la Taq ADN polymerase, amorces et sondes nucléotidiques, PCR, Southern blot, séquençage via ddNTP) et leur évolution ont permis (entre autre):

- ⇒ de faciliter l'analyse et l'identification des mutations/modifications de l'ADN et de l'expression des gènes
- ⇒ les applications sont nombreuses dans le domaine de la Santé en pathologie moléculaire (**étude des cancers, diagnostic de maladies génétiques, médecine prédictive**, etc...).

Exemples d'analyse de profils de séquençage en vue d'identification de mutation:



=>La superposition de 2 pics sur le profil diploïde d'un individu
Indique un hétérozygote et la présence d'une mutation ponctuelle (SNP)



=>Superposition de nombreux pics indique une hétérozygotie et une mutation de type insertion ou délétion d'ADN.

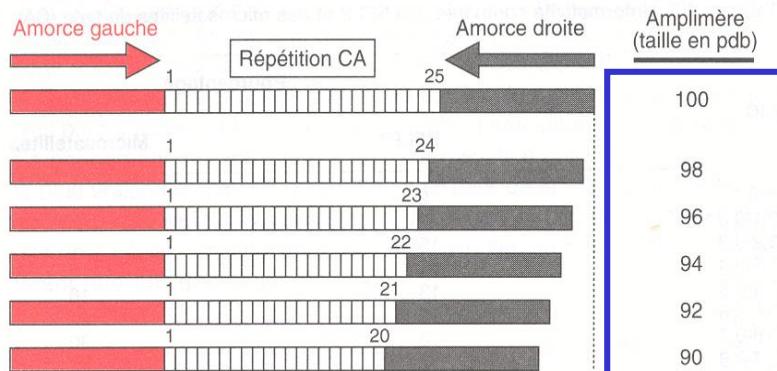
Position	504	505	506	507	508	509	510	511
NORMAL								
DNA	...GAA	AAT	ATC	ATC	TTT	GGT	GTT	TCC...
Protéine	Glu	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Ser
CF ΔF508								
DNA	...GAA	AAT	ATC	AT	- - T	GGT	GTT	TCC...
Protéine	Glu	Asn	Ile	Ile		Gly	Val	Ser

Figure 14-44 L'anomalie ΔF508 dans le gène CFTR
La lésion est une délétion de 3 bases à cheval sur les codons 507 et 508 (exon 10). Les deux nucléotides provenant du codon 507 et le nucléotide provenant du codon 508 reconstituent un codon ATT (Ile) sans perturbation du cadre de lecture, ni changement de sens du codon 507. Il en résulte la perte du résidu Phe en 508.

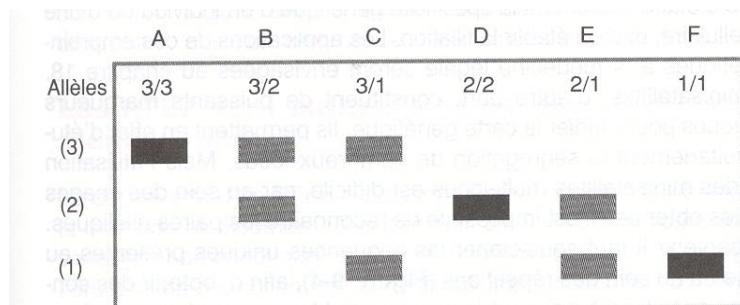
Exemple de délétion (F508del) impliquée dans maladie génétique monogénique (mucoviscidose)

Exemple d'utilisation de PCR ou séquençage dans la détermination du nombre de répétition STR (multi-allèleisme)

* Analyse de la variabilité d'un seul STR (cas de recherche du nombre de copie dans cas maladie génétique)



6 tailles de fragment PCR possibles (haplotypes)



Nombreux génotypes possibles (multi-allèlelique) sur ADN diploïde (ici seuls quelques uns montrés)

*Analyse de la variabilité de nombreux STR (cas de recherche d'empreinte génétiques : dérivent de l'analyse de 13 STR)

STR	MÈRE	ENFANT		PÈRE BIOLOGIQUE A?		PÈRE BIOLOGIQUE B?	
PentaE	7	12	7	15	15	11	11
D3S1358	14	18	17	18	15	17	14
TH01	9	7	8	9	7	8	6
D21S11	29	30	31	29	31	30	27
D18S51	14	12	14	12	19	12	11
D13S317	8	11	8	12	8	12	11
vWA	17	20	20	18	20	18	16
PentaD	12	14	12	14	11	12	11

=> Exemple ci-dessus de 8 STR analysés dans une recherche de paternité (le père biologique serait le A)

⇒ Exemple d'utilisation du Southern Blot en vue d'analyser l'organisation génomique d'une séquence d'ADN dans un génome

Sonde 1
(500pb)

Hybridation

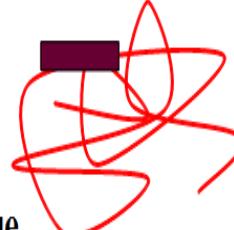


5,8kpb

Cas d'un profil simple

La sonde s'est hybridée sur un unique fragment d'ADN
(ne signifie pas que le gène fait 5,8 kpb mais qu'il est localisé dans un fragment génomique de 5,8 kpb)

E E E E E E E E E E E E E E



Le gène étudié serait en copie unique dans le génome

Sonde 2
(700pb)

Hybridation



Cas d'un profil complexe

20kpb

5kpb

0,5kpb

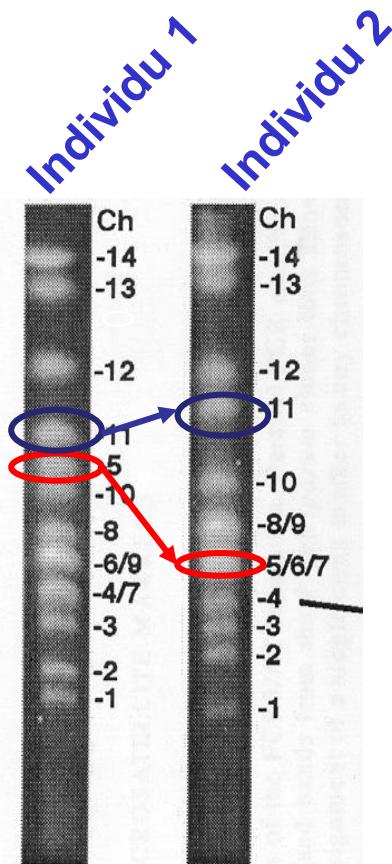
(0,5kpb) E E E E E E E E E E E E E E (5kpb) E (20kpb)

DNAFC

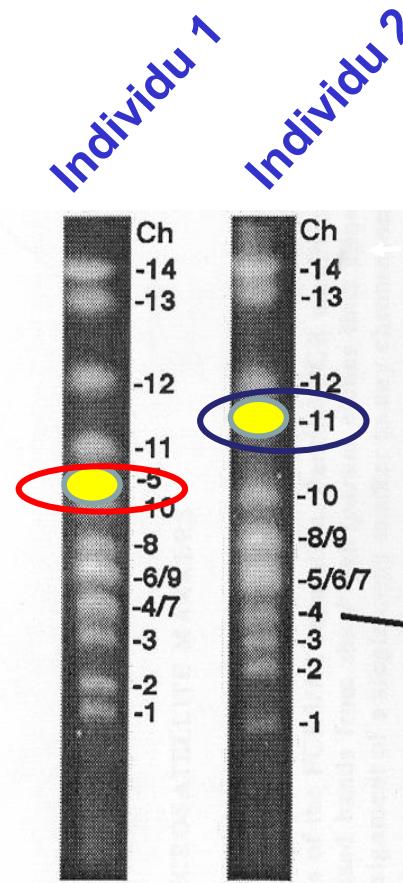
La sonde s'est hybridée sur plusieurs fragments d'ADN de tailles variables

Le gène étudié serait multicopie dans le génome

⇒ Exemple d'utilisation d'une hybridation moléculaire (type Southern Blot sur chromosomes séparé par électrophorèse) en vue d'analyser la translocation d'une séquence d'ADN dans un génome



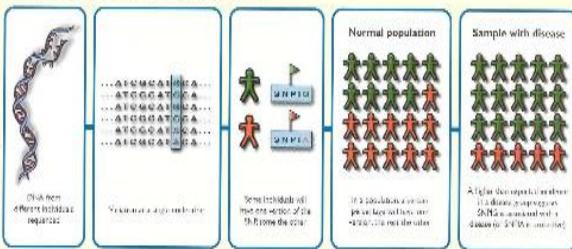
Mise en évidence (par coloration des chromosomes au BET) d'un polymorphisme chromosomique (chr5 diminué de taille alors que le chr11 augmente de taille)



Mise en évidence (par hybridation) d'une translocation chromosomique d'un gène (hybridation en jaune) situé normalement sur le chr5 et qui se retrouve sur chr11)

Analyse de la diversité des génomes au sein d'individus d'une même espèce par séquençage

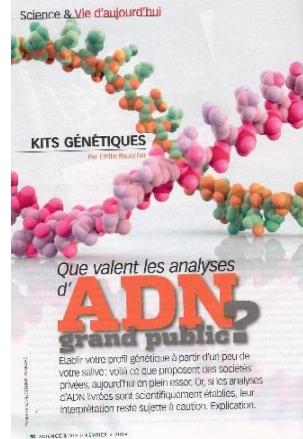
Figure 1: identification of SNPs and their association with disease



- identifier les mutations impliquées dans maladies (entre autre)

Testing cancer patients

- New machines allow us to test cancer patients for mutations like B-Raf V600E from blood samples in 24 hours.
- Recent work at CRI demonstrates the ability to monitor treatment response using mutation analysis.
- Information about these mutations can allow doctors to tailor the treatment for each patient.
- Patients and the NHS will benefit from "personalised cancer medicine".



- mise au point de kits génétiques pour le grand public (« médecine » prédictive ou personnalisée)

Variation in the genome

Uncovering the variations in the human genome – in particular the single nucleotide polymorphisms – is generating almost as much excitement as the sequence itself. A new map of 1.42 million SNPs, the output of the International SNP Working Group, will prove invaluable in the search for genetic contributions to common diseases.



Exemples d'Objectifs:

> FAITS & CHIFFRES

Les tests génétiques utilisés en laboratoire, pour le **dépistage** de maladies génétiques par exemple, sont apparus il y a une vingtaine d'années; il en existe aujourd'hui plus de **1400**, coûtant de **400 à 2400 €**. Il y a quelques années, lire un seul SNP coûtait **1 \$**, c'est moins de **1 centime** aujourd'hui. 23AndMe, société leader du secteur, demande **315 €** pour analyser **600000 SNPs** du **génome** d'un client, deCODEme **778 €** pour **1 million de SNPs**, Navigenics est plus cher (**1980 €**) mais fournit un conseil génétique.



- étudier la relation facteurs environnementaux, gènes et maladies

Début 2007, lancement de Biobank, la plus ambitieuse collecte de données biologiques jamais réalisée. 1% de la population britannique y participera. Objectif, explorer les liens entre facteurs environnementaux, gènes et maladies.

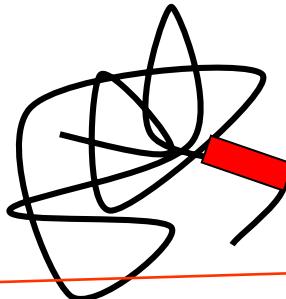
© Biobank

TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE II

(Appliquées à l'extraction, la manipulation et le clonage moléculaire d'un gène ou d'un génome ; transfert de gènes ou transgénèse)

= TRANSFERT DE GENE

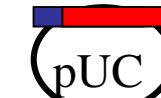
(2) Fragmentation du génome entier (n fragments d'ADN)



(1) Sélection d'un gène d'intérêt (1 fragment d'ADN)

Clonage/Amplification d'un (ou n) gène(s)/fragment(s) d'ADN après fragmentation du génome

Ligature



ADN

Vecteur

Transformation

AmpR

Cellule hôte

Sous-clonage
(changement de vecteur)

Sélection

2- Clonage de n fragments d'ADN
(banque d'ADN d'un génome)

1- Clonage d'un seul fragment d'ADN/gène

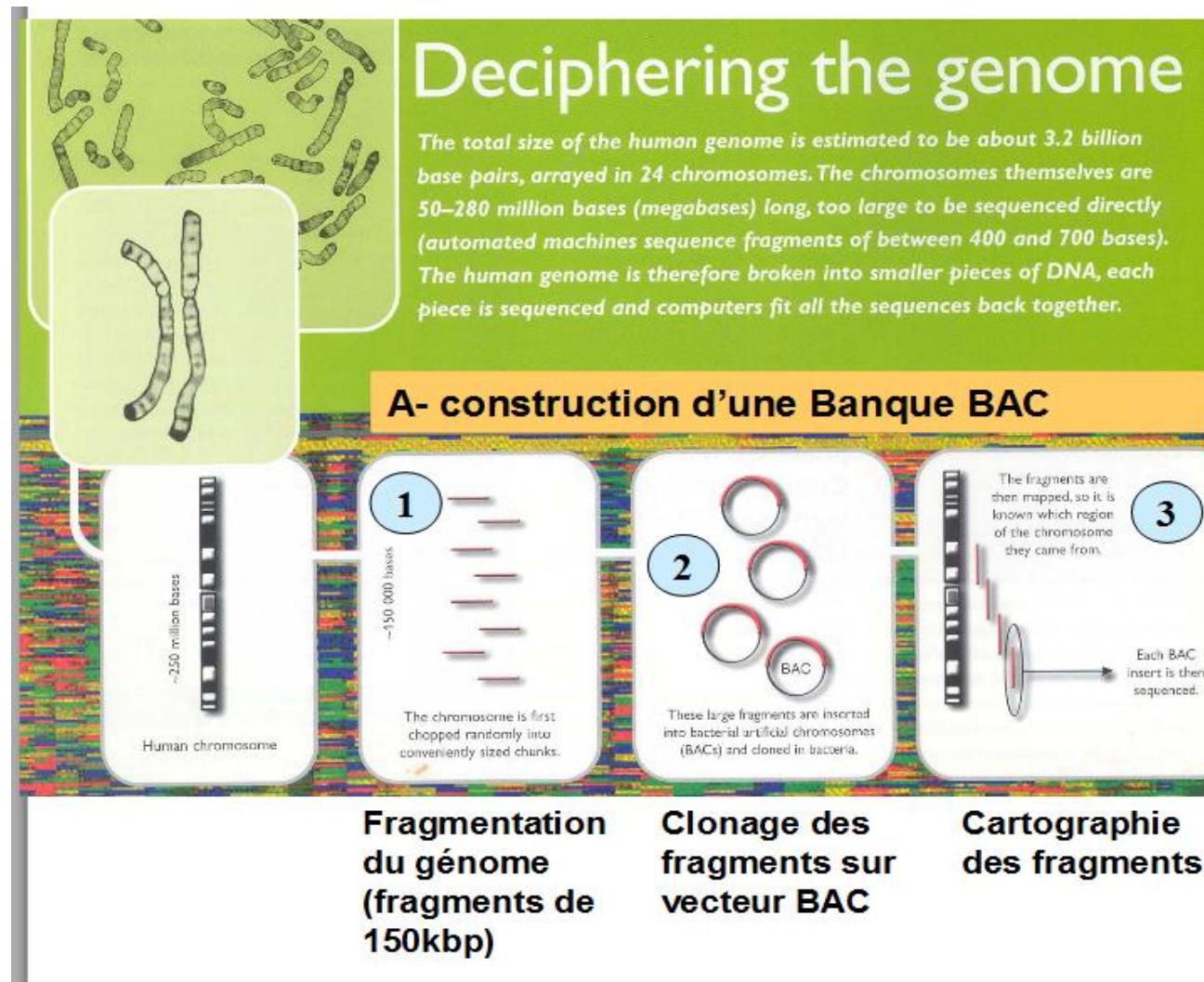
La découverte des techniques/outils de biologie moléculaire II (tels que vecteurs, enzymes de restriction, approches de clonage et transfert de gènes) et leur évolution ont permis (entre autre):

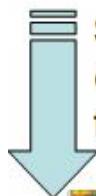
=> le développement du génie génétique : ensemble des techniques qui permettent d'isoler des gènes et de les étudier, puis de les modifier et de les **transférer de leur organisme d'origine à un autre**

=> les applications du transfert de gène(s) sont nombreuses dans le domaine de la Santé (**production de médicaments par OGM simple ou complexes, clonage d'animaux, clonage thérapeutique, thérapie génique, modifications du génome**, etc).

=> Utilisation du clonage moléculaire (transfert de fragments d'ADN sur un vecteur) en vue de déchiffrer des génomes entiers par séquençage

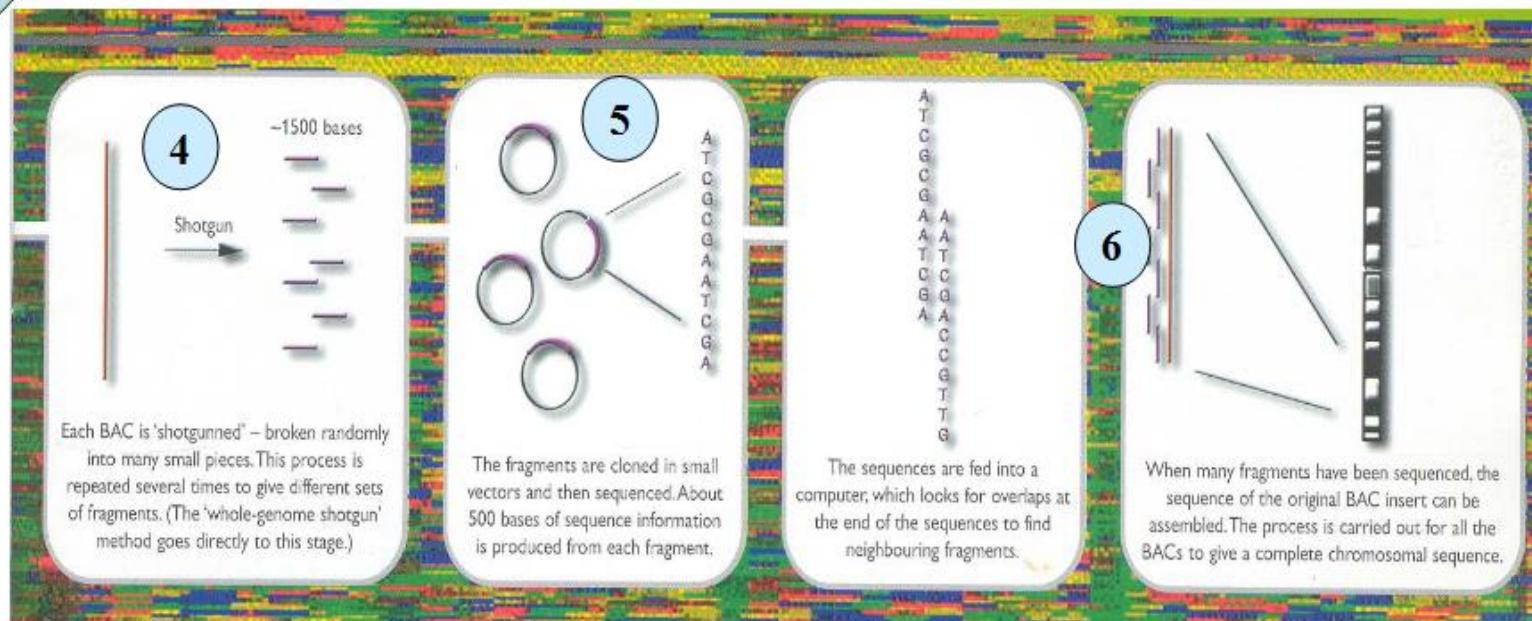
*les fragments d'ADN séquencés constituent des banques d'ADN de grands (vecteur de type BAC) ou petits (vecteur de type Plasmide) fragments





Séquençage de
chacun des
fragments

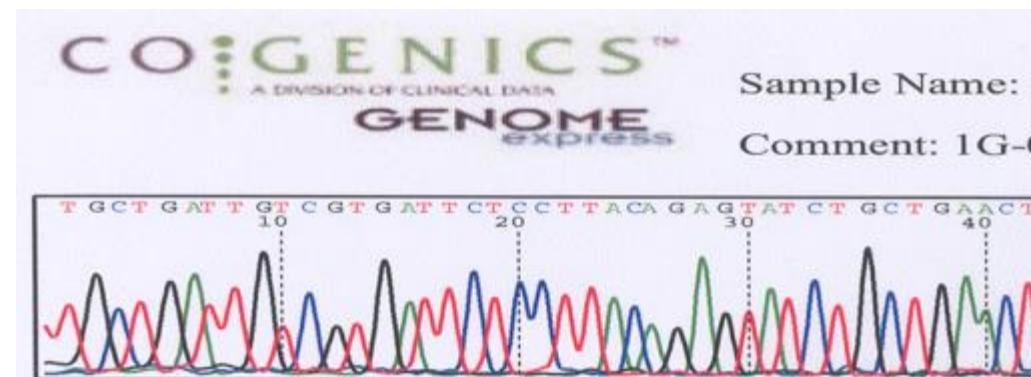
B- construction d'une Banque plasmidique pour chaque fragment d'ADN issu de la banque BAC



**Fragmentation
(shotgun) de chaque
fragment de 150 kbp
(en fragments 1-1,5 kbp)**

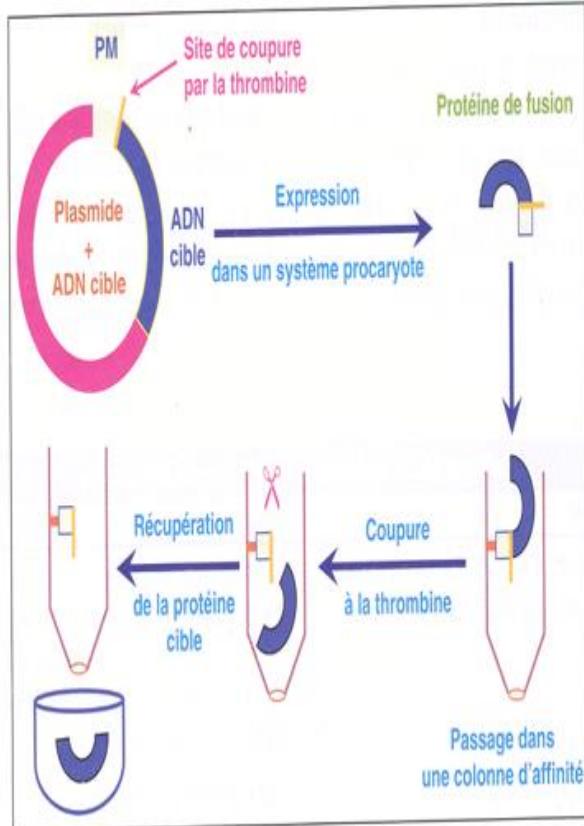
**Clonage/séquençage
des fragments sur un
plasmide**

**Cartographie
des petits
fragments**



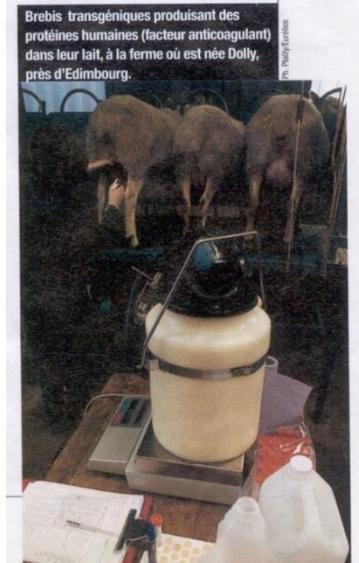
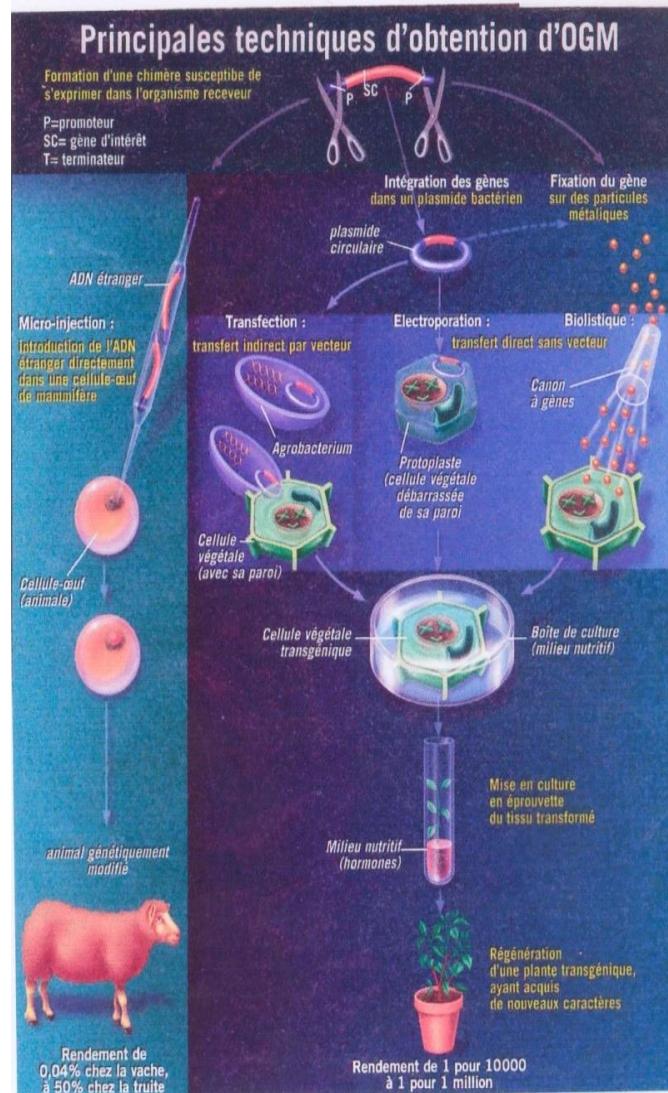
Transfert de gène appliqué à la production de protéines thérapeutiques

Dans des bactéries (OGM simple)



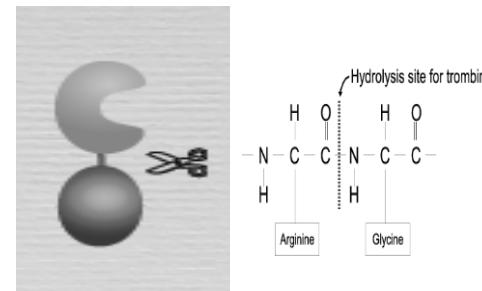
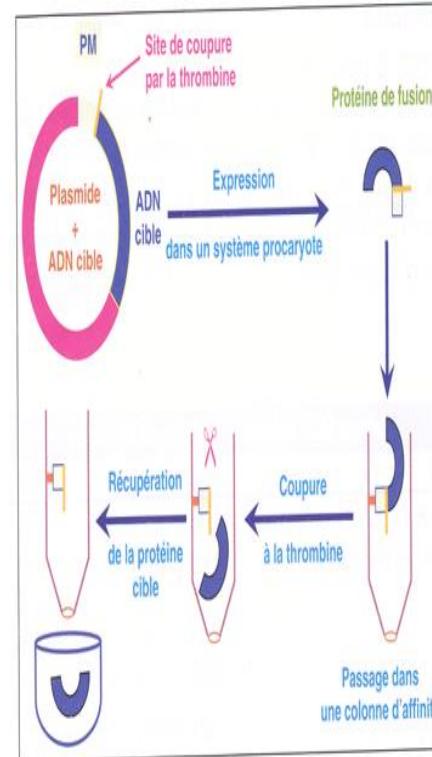
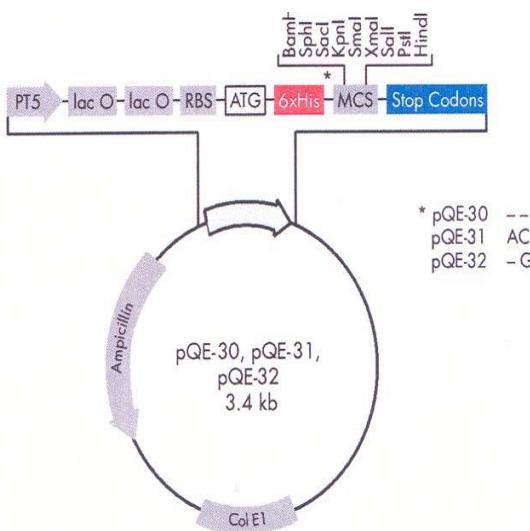
Ex: insuline, hormone de croissance, vaccin hépatite B

Dans des animaux et plantes transgéniques (OGM complexes)

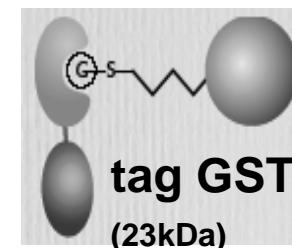


Transfert de gène appliqué à la production de protéines thérapeutiques (dans des bactéries = OGM simple)

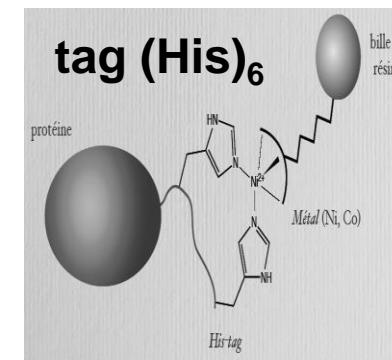
1- => l'ADN cible (ADNc) devra être cloné en phase (même cadre de lecture ouvert=orf) avec l'ATG d'une séquence nucléotidique présente sur le vecteur de clonage d'expression et codant pour une étiquette=tag (tag GST (Glutathion S transferase) ou (His)6 par exemple) qui servira à purifier la protéine thérapeutique des protéines bactériennes.



2- => La protéine thérapeutique est une protéine de fusion qui sera exprimée dans la bactérie puis purifiée sur colonne d'affinité (via ligand de l'étiquette GST ou (His)6 couplé à billes)



(Affinité avec Glutathion)



(Affinité avec Ni²⁺)

3- => L'étiquette est coupée de la protéine de fusion avant d'utiliser la protéine thérapeutique chez l'Homme.

Transfert de gène appliqué à la production de protéines thérapeutiques (Ex: dans des animaux transgéniques = OGM complexe)

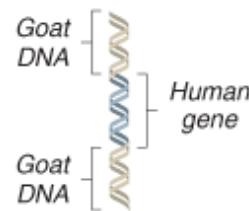
- **Atryn™**

- => Antithrombine alpha (anticoagulant)
- => AMM en 2006 (par l'EMEA)
- => Protéine extraite du lait de chèvre
- => Patients présentant une déficience de l'antithrombine



Bioengineering on the Farm

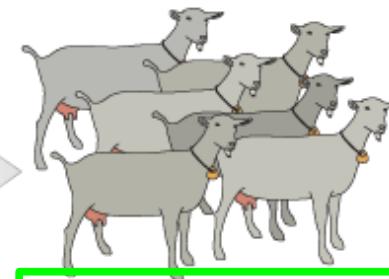
The Food and Drug Administration has approved the first drug produced in the milk of genetically engineered animals.



MODIFYING THE DNA
A human gene that produces the blood protein antithrombin is inserted into a short strand of goat DNA.

IMPLANTING THE DNA
The modified DNA is injected into the nucleus of a fertilized goat egg, which is then implanted into a female.

TESTING THE OFFSPRING
Kids born from the modified eggs are tested for the presence of antithrombin in their milk. Promising kids are bred normally to create a herd of modified goats.

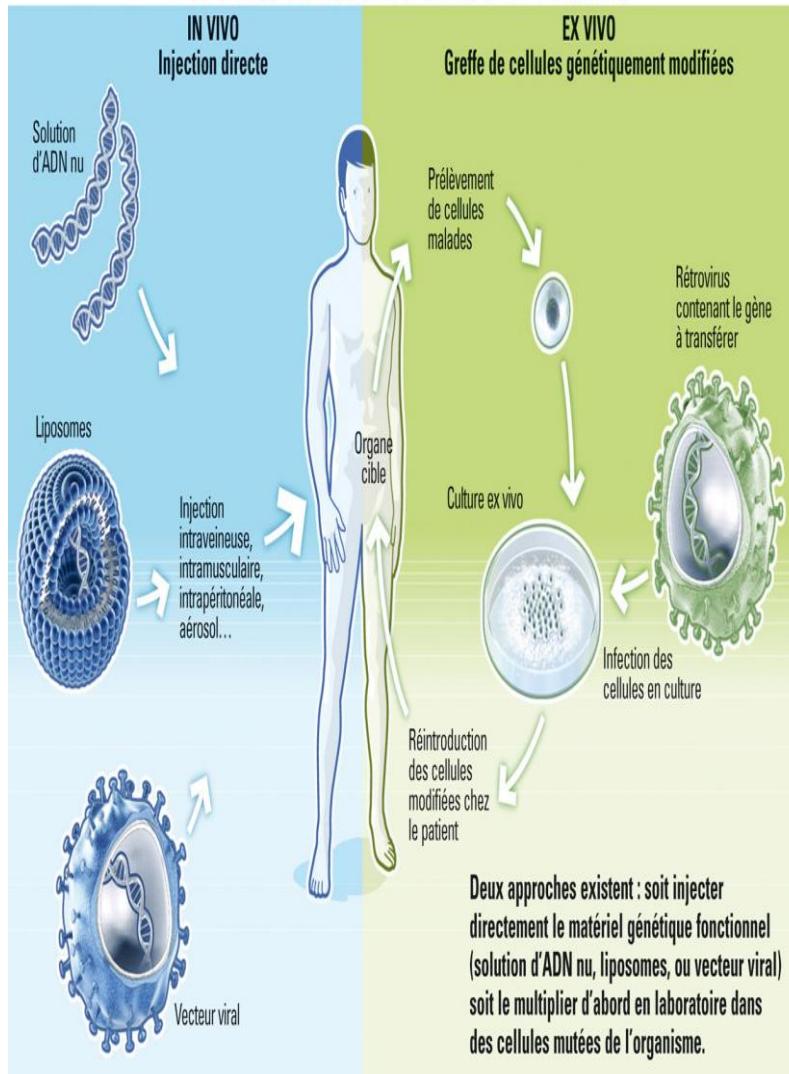


EXTRACTING THE PROTEIN
Milk from the herd is filtered and purified. Annually, each goat can produce as much antithrombin as 90,000 human blood donations.

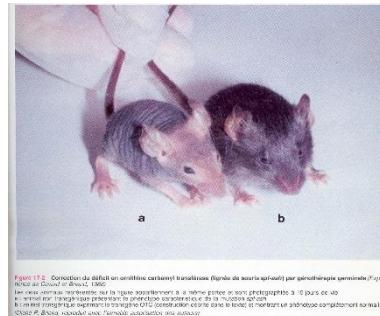
Sources: GTC Biotherapeutics

Transfert de gène en vue de combler une déficience protéique chez un patient atteint de maladie génétique grave (Thérapie génique)

LES DEUX VOIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE



OGM comme modèle d'étude des maladies génétiques humaines



Correction du déficit en Ornithine carbamyl Transferase (1988)

Modèle murin et thérapie génique

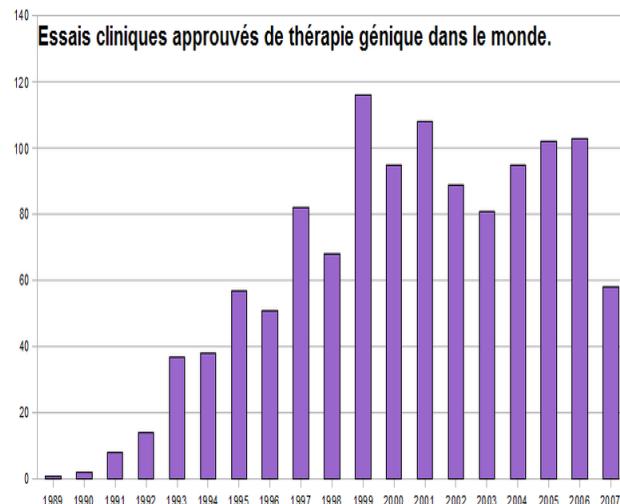
Lmna^{+/+} *Lmna*^{G609G/G609G} *Lmna*^{G609G/G609G}

Retentissement macroscopique

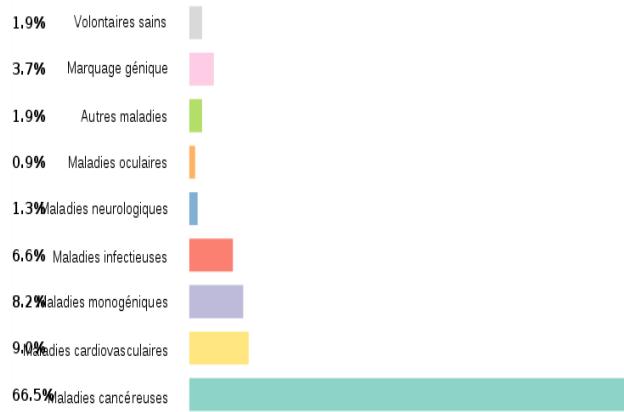


Exemple de la progeria ou syndrome de Hutchinson-Gilford
Causé par une mutation du gène *Lmna* (codant les laminas A et C)

Transfert de gène en vue de combler une déficience protéique chez un patient atteint de maladie génétique grave (Thérapie génique)



Essais cliniques de thérapie génique

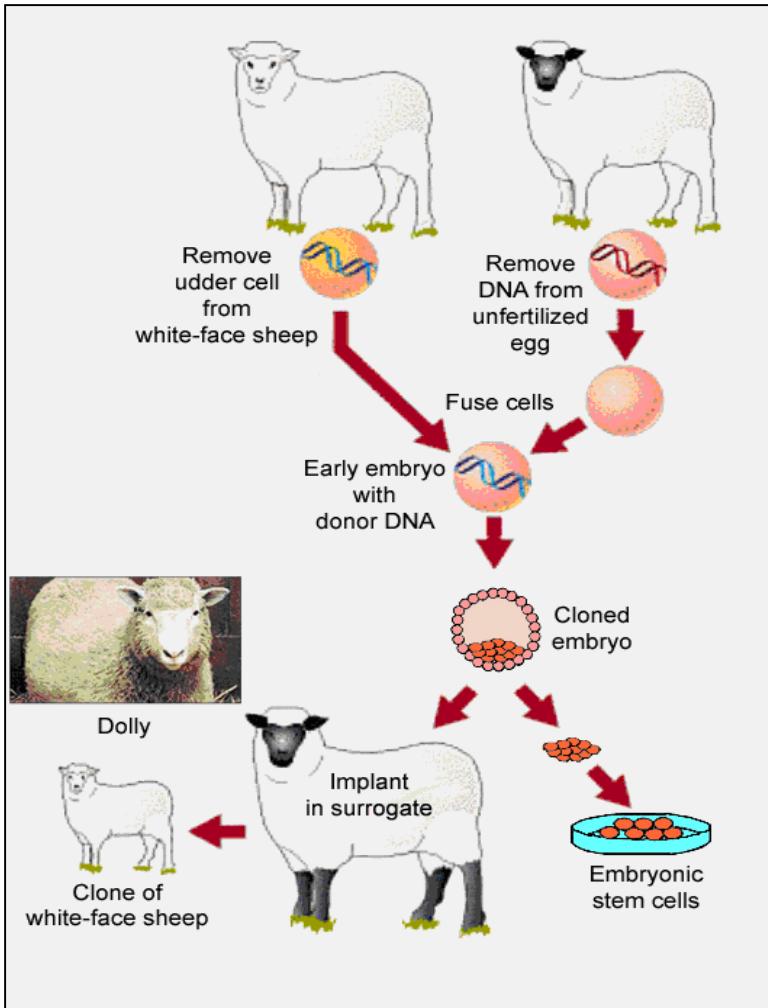


=> 1er succès de thérapie génique humaine: traitement de « bébé-bulle » (déficience immunitaire)
(Pr. Fischer et son équipe en 2000-2001 en France)

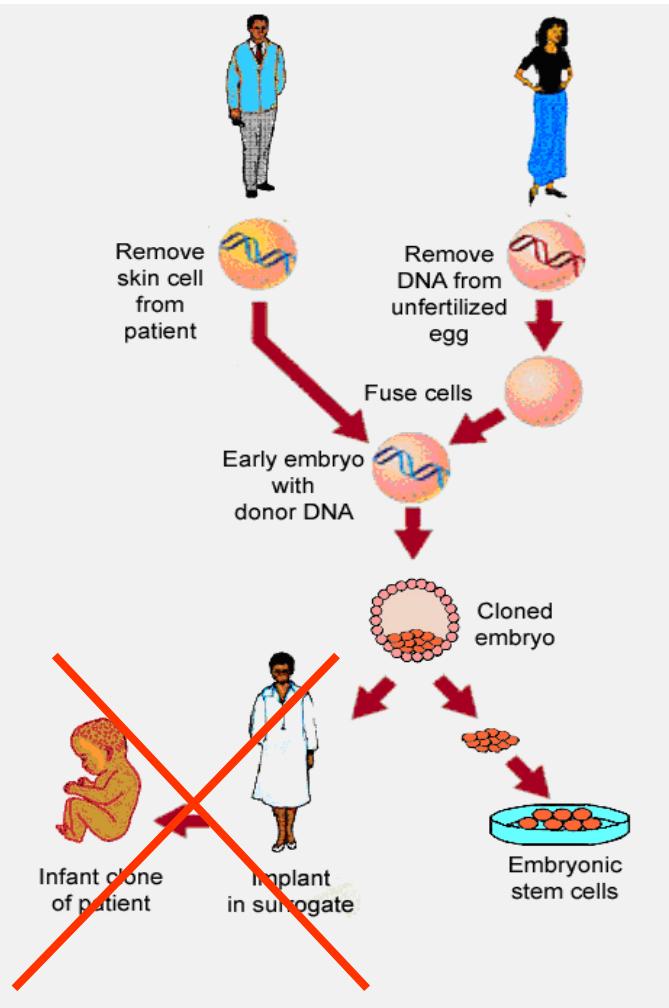


Transfert de gène via clonage reproductif et thérapeutique

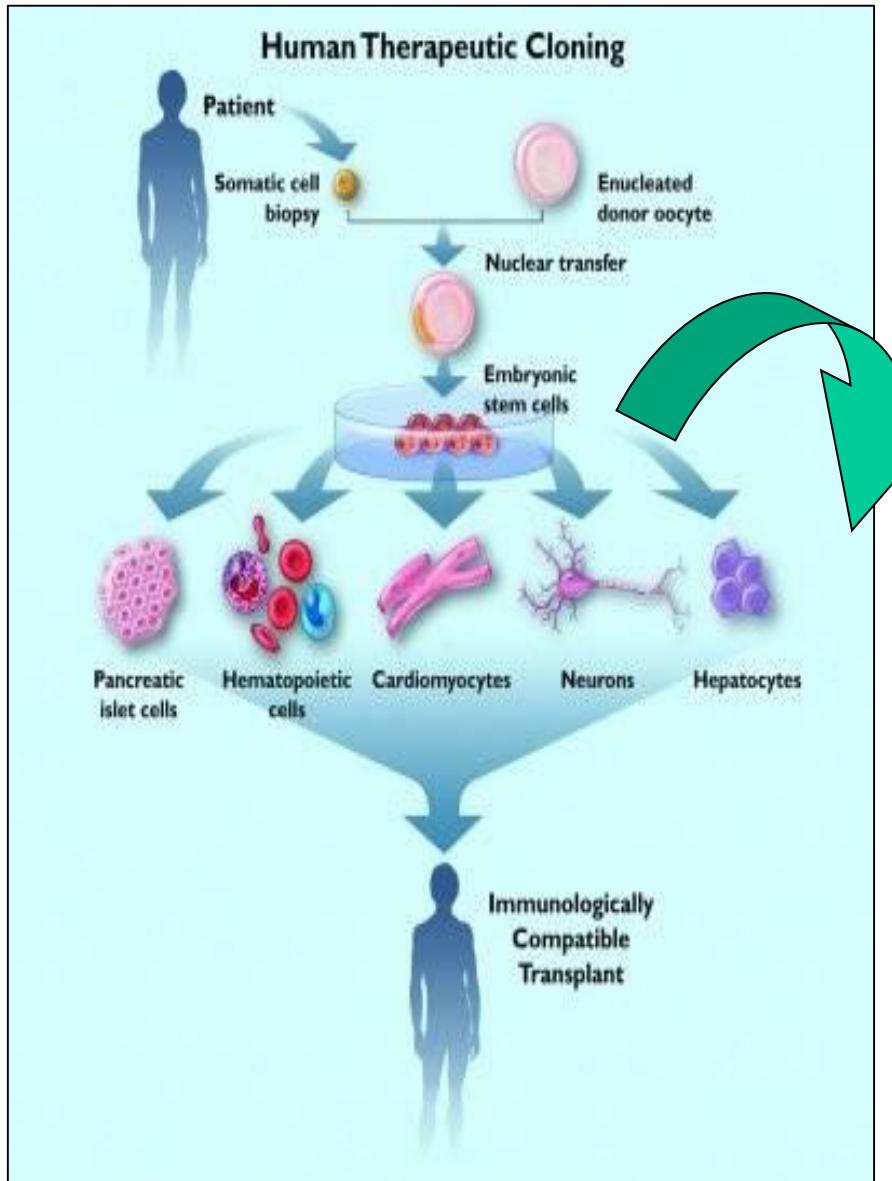
Le clonage reproductif animal (autorisé)



Le clonage reproductif humain (interdit)



Transfert de gène via clonage thérapeutique (en vue d'obtention d'organes)



Objectif: Reprogrammer (par transfert de gènes) des cellules différenciées en cellules indifférenciées (pluripotentes) capables d'être ensuite différenciées en n'importe quel type cellulaire (et donc tissus et organes)

=> 1ere méthode de transfert de gènes:
transfert d'un génome entier de cellule différenciée dans un ovocyte Énucléé.
Production de cellules embryonnaires

⇒ Découverte d'une nouvelle approche par transfert de quatre gènes dans des fibroblastes:
Avantage : pas de problème éthique lié à la manipulation de cellules embryonnaires



Prix Nobel de Médecine 2012 (S. Yamanaka)

Transfert de gène via clonage reproductif (en vue de production de médicaments)

Des vaches productrices d'insuline humaine



L'un des quatre veaux transgéniques de race Jersey porteurs du gène de l'insuline humaine

Un procédé technique très complexe, qui nécessite à la fois la maîtrise des outils de la biologie moléculaire la plus pointue, mais également une connaissance agronomique et vétérinaire poussée, ainsi que les meilleures conditions d'élevage. Même avec tous ces atouts, Biosidus annonce un taux de réussite ne dépassant pas 1%, l'immense majorité des tentatives de clonage échouant en cours de route. **Un programme coûteux, également, évalué à plusieurs millions de dollars.**

2007: Des scientifiques argentins (Société Biosidus) ont réalisé une première mondiale : la naissance coup sur coup de quatre **veaux clonés transgéniques porteurs du gène de l'insuline humaine**.

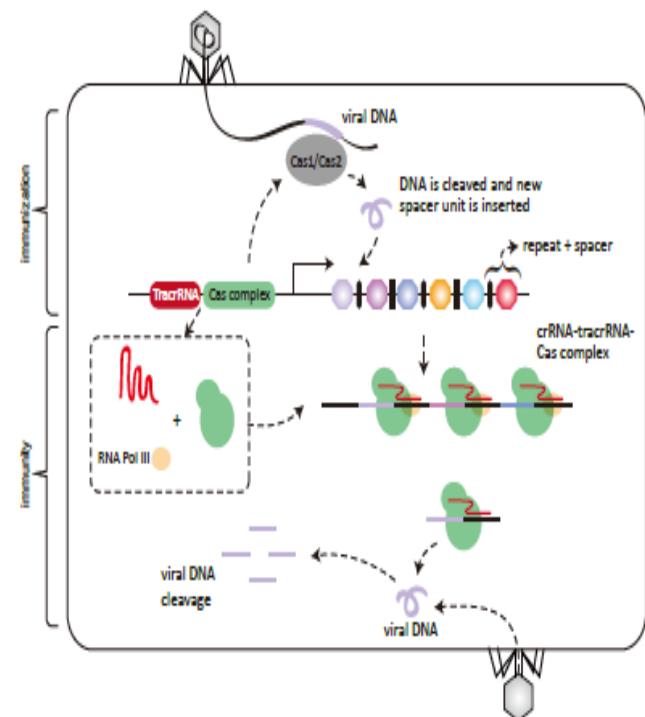
Des veaux qui, arrivés à maturité, pourront produire dans quelques mois une quantité importante de la précieuse protéine (**environ 6 kg/an**), utilisée dans le traitement de certaines formes du diabète. La protéine, **sécrétée dans le lait des mammifères**, n'aura alors plus qu'à être extraite du précieux liquide par la technique de chromatographie.

*« Avec seulement 25 vaches comme Patagonia, assure Carlos Melo, directeur de projet chez Biosidus, nous pourrons bientôt assurer la production d'insuline nécessaire pour traiter tous les diabétiques argentins, soit **150 kilogrammes de protéine par an** ». Un marché évalué, à lui seul, à plus de 150 millions de dollars.*

Transfert d'ADN en vue de modification génétique du génome (édition) via approche CRISPR-Cas

To download this handbook as a PDF, please visit
www.genscript.com/CRISPR-handbook.html

Figure 1: Mechanism of CRISPR-mediated immunity in bacteria



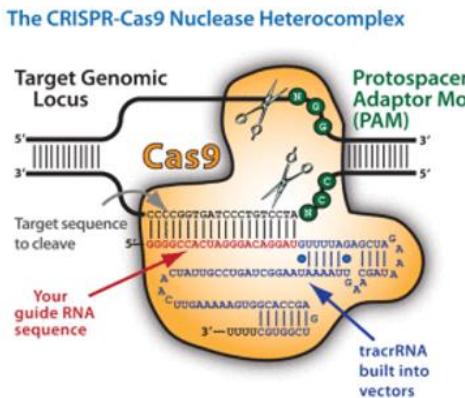
La méthode CRISPR-Cas9 a été récemment nommée découverte capitale de l'année 2015 par le magazine **Science**

(<http://www.sciencemag.org/news/2015/12/and-science-s-breakthrough-year>).

A l'origine, il s'agit d'un système de défense bactérien (système immunitaire adaptatif: Fig1) mais qui est aujourd'hui un outil précis, simple, et universel car il peut potentiellement modifier n'importe quel gène de n'importe quelle cellule.

Ce système, qui révolutionne la génétique, a été récemment détourné pour modifier le génome d'organismes vivants, plantes ou animaux. **CRISPR-Cas9 permet de détecter une partie spécifique de l'ADN et de la détruire, en coupant la double hélice d'ADN en deux parties, pour y induire une mutation ou y insérer un gène, etc**

<https://aninfinityoftheses.wordpress.com/page/2/>
sept2014



Transfert d'ADN en vue de modification génétique du génome (édition) via approche CRISPR-Cas

Un bref historique

La découverte est un exemple formidable de ‘détournement’ d’une découverte scientifique dans un domaine (microbiologie) au profit d’un autre domaine (l’édition et la modification des génomes), avec des applications aujourd’hui presque illimitées.

Cette histoire commence donc en 1987 par une simple observation qui est restée longtemps confidentielle : la présence d’une région inhabituelle de **5 répétitions partiellement palindromiques** dans le génome d’*E. Coli* (IMMUNIZATION sur la Fig1) à l’extrémité du gène de l’isozyme alkaline phosphatase.

Il faudra ensuite attendre 2002 pour que l’équipe de Léo Shouls aux Pays-Bas mette en évidence la présence de ces séquences dans la plupart des génomes bactériens. Et c’est aussi en 2002 que l’acronyme CRISPR (pour ‘Clustured Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats’) deviendra définitif.

A quoi pouvaient bien servir ces séquences répétées ? Les premiers éléments de réponse arrivent en 2005 et ce fut plutôt une surprise. Ces séquences des génomes bactériens étaient identiques à des séquences des génomes de bactériophages ! (virus qui n’infectent que les bactéries). Et de manière remarquable, les bactéries contenant ces séquences de phage étaient résistantes à ce même phage.

En d’autres termes, en intégrant des fragments d’ADN étranger au sein de son propre chromosome, la bactérie acquiert une résistance à ce phage. Comment ? Une partie de la réponse a été apportée en 2007 par une équipe française travaillant pour Danisco, une société de l’industrie laitière qui cherchait à protéger la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus* des attaques de bactériophages.

Pour simplifier, quand le phage réinfecte la bactérie : (1) il est reconnu, (2) la bactérie exprime sous forme d’ARN ces séquences répétées CRISPR qui correspondent à des fragments du génome du phage, (3) ces crRNAs forment un complexe avec les protéines Cas (endonucléase) et (4) s’apparentent avec l’ADN de phage pour le détruire (= IMMUNITY sur la Fig1). Une sorte de système immunitaire qui utilise l’ADN étranger et non pas le couple antigène/anticorps pour se défendre.

Tout explose en 2012 avec un article publié dans *Science* par les équipes de **Jennifer Doudna (USA) et Emmanuelle Charpentier (France)**. Ces 2 femmes ont donc été les premières à démontrer que ce système immunitaire bactérien pouvait être reprogrammé à façon pour modifier n’importe quel gène de n’importe quel organisme.

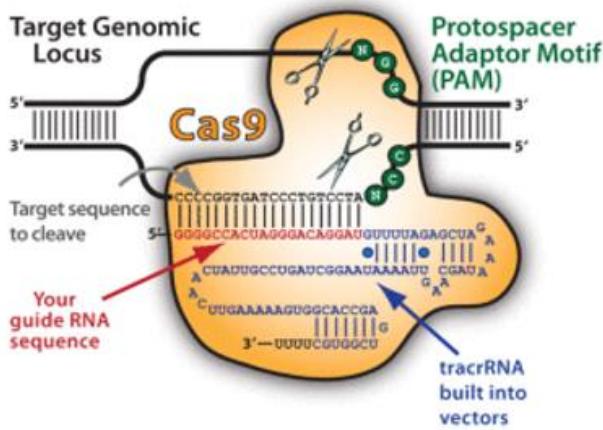
<https://aninfinityofhypotheses.wordpress.com/page/2/> (septembre 2014)

Transfert d'ADN en vue de modification génétique du génome (édition) via approche CRISPR-Cas

Derrière cet acronyme un peu barbare (CRISPR pour ‘Clusted Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats’) se cache l'une des plus importantes révolutions technologiques que la biologie moléculaire a connu ces 40 dernières années, au même titre que le clonage moléculaire ou la PCR.

Le principe : programmer une endonucléase bactérienne (protéine qui coupe l'ADN) appelée **Cas9** (C.AS. pour CRISPR Associated) avec des petits ARN non codants (qui agissent **comme guide**) pour permettre le clivage de manière spécifique à l'endroit désiré du génome.

The CRISPR-Cas9 Nuclease Heterocomplex



CRISPR/Cas9 : Emmanuelle Charpentier futur prix Nobel ?

Femmes, Science et Cocorico !



⇒ Grâce à ce nouvel outil de génie génétique, cibler n'importe quel gène dans une cellule pour le modifier devient presque un jeu d'enfant. **Eteindre ou allumer l'expression d'un gène, le modifier, le réparer, l'enlever; tout est aujourd'hui possible!!!!**

<https://aninfinityofhypotheses.wordpress.com/page/2/>

I- POLYMORPHISMES DU GENOME HUMAIN ET PATHOLOGIE MOLECULAIRE (MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES)

II- MECANISMES ET CONSEQUENCES DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES

III- METHODES D'IDENTIFICATION DES MUTATIONS DELETERES A L'ORIGINE DES MALADIES GENETIQUES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE)

A- METHODES DE BASE

- Notions d'hybridation moléculaire (Tm, sondes, amorces nucléotidiques)
- Le Southern blot
- L'amplification génique par PCR (classique et en temps réel)
- Le séquençage enzymatique d'un ADN (Sanger & Coulson)

B- APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC

- Le diagnostic génotypique
- détection SNP par séquençage
- Détection RFLP ou STR/VNTR par Southern blot ou PCR
- autres méthodes de diagnostic dérivées de la PCR (SSCP, DGGE, HRM, DHPLC, MLPA) et du Séquençage (pyroséquençage et SMRT) (**UE optionnelle Maladies Héréditaires du Métabolisme**)

(C- AUTRES APPLICATIONS)

- Organisation génomique d'un gène dans un génome (par Southern blot)
- Détection d'un gène dans une banque (par Southern ou PCR)
- Tests génétiques grand public et médecine prédictive (séquençage)

IV- APPROCHES THERAPEUTIQUES DES MALADIES HEREDITAIRES MONOGENIQUES (TRANSFERT DE GENE)