

Tables des matières

Biologie et génétique moléculaire.....	5
1. Organisation du génome	5
1.a. Le génome humain dans le noyau et la mitochondrie.....	5
1.a.1. Organisation du génome humain dans un noyau tridimensionnel	5
1.a.2. Composition du génome humain	6
2. Maintient de l'information génétique	11
2.a. Nombres de Chromosomes:.....	12
2.a.2. Composition et arrangement des Chromosomes:.....	12
2.b. Mutations au niveau des gènes:	12
2.b.1. Classification des mutations	13
2.b.2. Mutations pendant la réplication.....	13
2.b.3. Transition et transversion	14
2.b.4. Transmission	14
2.b.5. Mauvais appariement du brin glissé- slippage	15
2.b.6. Mutation par recombinaison homologue.....	15
2.b.7. Mutation par conversion génique.....	15
2.b.8. Mutation par éléments mobiles (transposons)	16
2.c. Transposons chez les mammifères type II.....	16
2.c.1. Retrotransposons chez les mammifères type I	16
2.b.9. Mutagenèse par rétrotransposition.....	17
2.b.10. Mutagenèse par agents chimiques ou physiques.....	17
2.d. Mécanismes de réparation.....	20
2.d.1. Réparation pendant la réplication (mismatch)	20
2.d.2. Réparation directe post-réplication (photoréactivation)	20
2.d.3. Bases excision repair.....	21
2.d.4. Nucléotide excision repair	21
2.d.5. Mismatch Repair (MMR)	22
2.d.6. La Recombinaison homologue.....	24
2.d.7. Réparation d'une cassure double brin (CDB) par recombinaison homologue.....	25
2.d.8. La Réparation de cassures de doubles brins par fusion Non-Homologous End Joining (NHEJ)	26
2.e. Réparations principales	27
2.e.1. Les défauts dans la réparation causent des maladies	27
2.e.2. Les défauts dans la réparation héréditaires.....	27
2.e.3. Les tissus cancéreux accumulent des défauts dans plusieurs voies.	28
3. Les outils de la biologie moléculaire.....	29
3.a. Enzymes de restriction.....	29
3.a.1 Les cartes de restrictions.....	29
3.b. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	30
3.c. Hybridation selon Southern	30
3.d. Clonage moléculaire	32
3.d.1.Crispr/Cas9 : une révolution récente	32
3.e. PCR et séquençage du DNA - Polymerase chain reaction (PCR).....	33
3.e.1. PCR - Utilise:	33
3.e.2. Principe de la PCR.....	34
3.e.3. PCR: décomposition d'un cycle	34
3.e.4. PCR: amplification	34
3.e.5. PCR: détection des produit de PCR.....	35
3.e.6. Clonage moléculaire.....	35
3.f. Applications du génie génétique.....	37
3.f.1. 555 entrées autorisées à usage humain	37
3.f.2. Un vaccin produit dans des cellules d'insecte	38
3.f.3. Animaux transgénique.....	38
3.g. Introduction à la génomique	39
3.g.1. Vecteurs en thérapie génique	39
3.g. CAR T cells en cancérologie.....	39
3.g. Stratégies vaccinales	40
4. Génomique et analyse génotypique	40
4.a. Carte génétique.....	40
4.b. Génotypage	41
4.b.1. Pénétrance d'un gène.....	41
4.b.2. Expressivité.....	41
4.b.3. Le risque génétique.....	41
Identification d'un locus causant une maladie.....	42
Identification d'une mutation causant une maladie	42
Exome sequencing.....	42
Empreinte génétique	43
Polymorphisme, variant, mutant	43
SNP	44

Étude d'association pangénomique	44
GWA identifie des gènes de susceptibilité	44
Génétique inverse : du gène à la fonction.....	44
Génétique fonctionnelle: séquençage d'ARN (RNA-Seq)	45
Conclusion	45

Développement Génétique moléculaire

Objectif généraux

- Connaître/ Description de l'organisation du génome humain
- Connaître les principes de base du maintien de l'information génétique et des variations dans le génome
- Connaître les principes de base du génie génétique et de ses applications
- Connaître les principes de base de l'analyse génotypique et de ses applications

Objectif spécifique

- Description de l'organisation du génome humain
- Description des familles de gènes et des superfamilles de gènes
- Définition des séquences répétées dispersées et en tandem
- Comparaison des génomes humains, de singe et de souris
- Analyse des variations dans le génome humain, types et origines des mutations
- Description des mécanismes de réparation des mutations et maladies héréditaires
- Connaître les principes de base du génie génétique : les enzymes de restriction et les cartes de restriction, les analyses de liaison génétiques et les RFLPs, le PCR et le séquençage du DNA, les principes du clonage moléculaire
- Comprendre les applications du génie génétique : protéines recombinantes, organismes génétiquement modifiés et thérapie génique
- Connaître les principes de base de l'analyse génotypique et de ses applications en génétique, les empreintes génétiques, la recherche en paternité, l'utilisation des polymorphismes pour comprendre l'évolution, les SNPs et leur application en pharmacogénomique,

Guide d'apprentissage du cours Bmed1.3 Biochimie (F. Martinon) 2022

L'examen porte sur la matière du polycopié et le cours. On peut aussi y tester la capacité de raisonner sur une situation inconnue mais similaire. De façon générale l'accent est mis sur une bonne connaissance et une bonne compréhension des principes de base. Il est important de comprendre les liens et connexions entre les différentes parties du cours. En plus de l'examen, ce cours sert aussi de base pour suivre les cours du professeur Andrea Superti-Furga (Génétique générale). Voici quelques mots clés et guides pour votre apprentissage. Ces indications ne sont pas exhaustives mais couvrent les thèmes principaux à comprendre et à connaître. Bon travail.

Biologie et génétique moléculaire

1 Organisation du génome

- Spécificités des génomes nucléaires et mitochondriaux (paradoxe de la valeur c)
- Notion de territoires chromosomiques et savoir reconnaître un caryotype
- Avoir une notion du nombre de gènes présents dans le génome, la taille du génome humain, des gènes et la composition des différents types d'ADN. Pas besoin de connaître les chiffres avec précision mais un ordre de grandeur.
- Notions de cluster de gènes et familles de gènes. Savoir expliquer la genèse de ces groupes. Savoir interpréter et expliquer les schémas de la page 9 et 10 et 11. Comprendre les notions d'homologie, paralogie et orthologie. Ne pas connaître par cœur la nomenclature des gènes de l'hgb (p11), de Ig (p13) ou des kinases (p14)
- Savoir expliquer la notion de domaine conservé, homologie partielle, genèse, bien comprendre les schémas des p12 à 14.
- Savoir ce que c'est qu'une Immunoglobuline, et reconnaître sa structure. Fonction du domaine Ig.
- Connaître et pouvoir comparer les différents types de séquences répétées. Avoir une idée approximative de leur distribution dans le génome humain. Satellite, minisatellite, microsatellite, LINE, SINE etc..
- Répétition a trinuécléotides : connaître l'importance et le rôle dans certaines maladies. Savoir citer les 2 maladies en gras. Pas besoin de connaître les détails de la figure et table de la p 19.

2 Maintien de l'information génétique

- Connaître et comparer les termes liés au nombre de chromosomes de la table p22. Pouvoir expliquer la figure de la p22 et p23. Connaître et expliquer les termes duplication, délétion, inversion, translocation.

- Savoir classer les mutations selon les définitions de la p25.
- Transitions et transversions, tautomères, slippage, mutation par RH, conversion génique, mutation par transposons (savoir reconnaître et définir, pouvoir donner des exemples)
- Bien comprendre la figure de la p29 et p32
- Transposons, connaître l'exemple LINE1, savoir reconnaître un retrotransposon, et le mécanisme p36 (reverse transcriptase : rôle)
- 1
- Connaître les différents types de mutagenèses présentés. Dépurination, désamination, analogues de bases, UV, etc.. Décrire les effets, reconnaître et comparer, expliquer les mécanismes de propagation et de réparation pour chaque situation.
- Mécanismes de réparation: BER, NER, MMR, RH, NHEJ. Connaître les différents mécanismes (étapes principales) pouvoir les comparer faire le lien avec les mutations.
- RH et CDB bien comprendre et pouvoir expliquer les figures p 56-57. Notion de conversion et cross-over. Différence cellules somatiques et germinales.
- Xeroderma pigmentosum, HNPCC, Fanconi Anemia, BRCA1 et 2-cancer du sein/ovaire : origine et phénotype.
- P50, pas besoin de connaître tous les enzymes cités.
- Lien entre cancer et mutations. Traitements avec agents induisant des dommages dans l'ADN

3 Les outils de la biologie moléculaire

- Enzymes de restrictions, nature et rôle. Site palindromique, expliquez p67 les coupures, cohésives etc.. rôle de la ligase. Ne pas connaître le nom ou la spécificité des enzymes présentés.
- Cartes de restriction, utilité, procédure (digestion électrophorèse, détection)expliquez le schémas de p71
- Notion de sonde marquées (p72)
- Southern et Northern, différences, utilité et procédure
- Analyse par RFLP (but et procédure)
- Cripsr/Cas9 (expliquer et utilités principales) Rôle de RH(CDB)
- PCR comprendre, connaître les ingrédients et la procédure et expliquer, applications
- Clonage, principe, but (plasmides/vecteurs)
- Séquençage Sanger : Comprendre savoir interpréter un chromatogramme (exemple celui de la p109), applications et limitations comparaison avec NGS
- NGS, principe de base, application, limitations
- Génie génétique : applications donner quelques exemples
- Vaccin SARS-Cov2, citer 3 type de vaccin (ARN, Adenovirus, protéine)
- Souris KO et cKO expliquer le but les différences, Différences entre méthode RH et Cripsr/Cas9
- Vecteurs viraux : utilité, application : CART comprendre la technique pas besoin de connaître tous les détails.

4. Génomique et analyse génotypique

- Carte génétique Carte physique : différence, notion de cM.
- Pénétrance et Expressivité (définitions, savoir utiliser ce vocabulaire dans le contexte d'une mutation)
- Maladie mono ou polygéniques (différences)
- Exome sequencing (stratégie et utilité) comprendre les schémas p111. Ne pas connaître les données TRNT1, ou la maladie en question car très rare
- Notion de SNP
- Étude pangénomique (GWA) : principe de base, objectif. Comprendre, pas connaître les gènes ou données des pages 115 et 116
- RNA-seq (principe de base, objectif) Comprendre l'exemple pas connaître. Pouvoir interpréter un exemple similaire.

Biologie et génétique moléculaire

Plan du cours

1. Organisation du génome
2. Maintien de l'information génétique
3. Les outils de la biologie moléculaire
4. Génomique et analyse génotypique

1. Organisation du génome

1.a. Le génome humain dans le noyau et la mitochondrie

Le génome humain dans le noyau et la mitochondrie

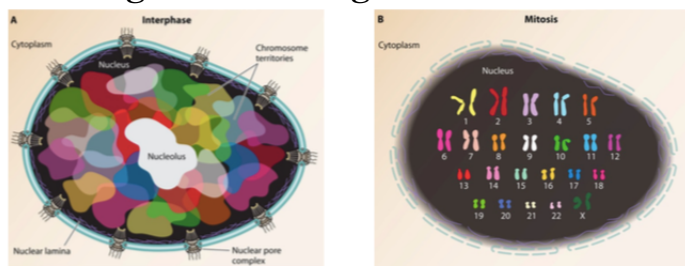
Le génome nucléaire

- origine paternelle et maternelle; 23 chr. paternels (22+X ou Y), et 23 chr. maternels (22+X)
- 3 milliards de paires de bases/génome haploïde
- < 25'000 gènes (1 Millions de protéines? Epissage alternatif; Modifications post-traductionnelles: Phosphorylations, acétylations, etc..)

Le génome mitochondrial

- ADN circulaire d'origine maternelle (1 origine de réplication/ molécule)
- 16'000 paires de bases
- 37 gènes; des mutations dans ces gènes peuvent aussi être responsables de maladies héréditaires, ex: [Neuropathie optique héréditaire de Leber \(OMIM 535000\)](#)
- la plupart des protéines présentes dans la mitochondrie sont codées dans le génome nucléaire; 22 ARNt et 2 ARN ribosomiques sont codés dans la mitochondrie. Code génétique particulier!

1.a.1. Organisation du génome humain dans un noyau tridimensionnel



(A) Territoires chromosomiques observés pendant l'interphase. Des complexes de pores nucléaires sont représentés perforant l'enveloppe nucléaire. Le nucléole est représenté en blanc. La lamine nucléaire est représentée comme un maillage filamentaire à l'intérieur de la double membrane nucléaire. (B) Exemple de caryotype féminin normal

La taille des génomes eucaryotes varie

Chez les eucaryotes la taille du génome varie énormément, cela n'a aucun rapport avec les idées intuitives de complexité morphologique.

Chez les procaryotes, taille du génome et nombre de gènes sont fortement corrélés, mais **chez les eucaryotes, la grande majorité de l'ADN nucléaire n'est pas codant.**

La figure illustre les moyennes et la distribution de la taille des génomes qui ont été observés jusqu'à présent dans les principaux groupes d'organismes vivants. Ces groupes sont disposés selon des idées communes de complexité pour accentuer davantage la disparité entre ce paramètre et la taille du génome. (**paradoxe de la valeur C**)

1.a.2. Composition du génome humain

Taille du génome 3×10^9 paires de bases/génome haploïde

Nombre de gènes: < 25'000

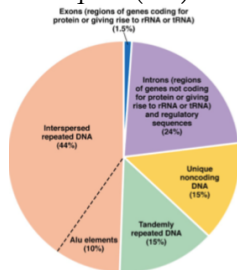
Taille moyenne d'un gène: 10-15 kb (promoteur, exons et introns)

Les gènes sont interrompus (exons/introns)

Large régions intergéniques (25-30 kb)

Présence de 3 types de séquences:

- hautement répétées (<100x)
- intermédiaires (moyennement répétées)(3-100x)
- uniques (1-2)



1.a.2.a. Familles de gènes

Type de séquences **moyennement répétées**

Les gènes appartenant à une famille de gènes dont les produits ont des séquences proches; donc des structures proches; donc des **fonctions semblables**.

Les gènes, appartenant à une famille de gènes ont évolués à partir d'un gène ancestral commun. On parle d'homologues. Mécanismes impliqués sont la conversion génique; duplication, fusion etc..

Les gènes dans une famille de gènes peuvent être situés sur le même chromosome (gene cluster) ou sur des chromosomes différents.

1.a.2.b. Cluster de gènes

Un cluster est un **ensemble de plusieurs gènes**, qui dérivent d'un **ancêtre unique, commun**, obtenus par duplications successives au cours de l'évolution et localisé dans la même région chromosomique.

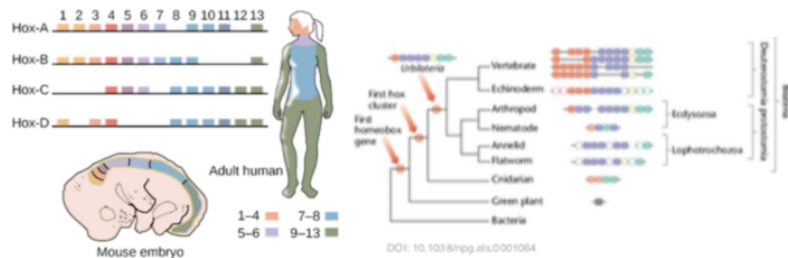
Intérêt: contrôle spatio-temporel; coordination de l'expression; exemple: famille des gènes Hox

Les gènes Hox sont des gènes conservés codant pour des facteurs de transcription qui déterminent le cours du développement embryonnaire chez les animaux.

Chez les vertébrés, les gènes ont été dupliqués en quatre groupes: Hox-A, Hox-B, Hox-C et Hox-D. Les gènes de ces groupes sont exprimés dans certains segments du corps à certains stades de développement. Voici l'homologie entre les gènes Hox chez la souris et l'homme.

Notez comment l'expression du gène Hox, comme indiqué par des ombres orange, rose, bleu et vert, se produit dans les mêmes segments du corps chez la souris et chez l'homme

Evolution du cluster Hox. De nombreux taxons ont acquis des gènes hox par duplication de gènes uniques ou de cluster entiers; d'autres ont perdu des gènes hox

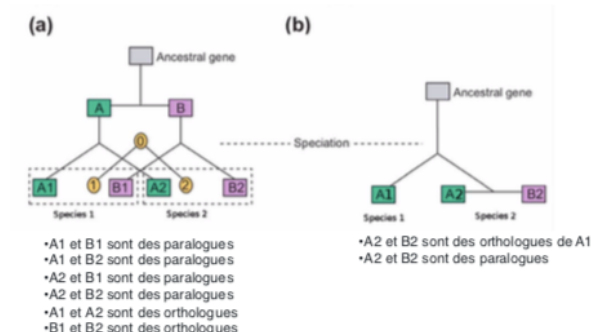


1.a.2.c. Homologues, Paralogues et Orthologues

L'homologie est le terme qui décrit la similitude entre plusieurs gènes.

Les orthologues sont des gènes homologues qui sont le résultat d'un événement de spéciation.

Les paralogues sont des gènes homologues qui sont le résultat d'un événement de duplication.



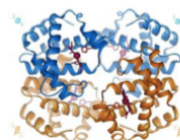
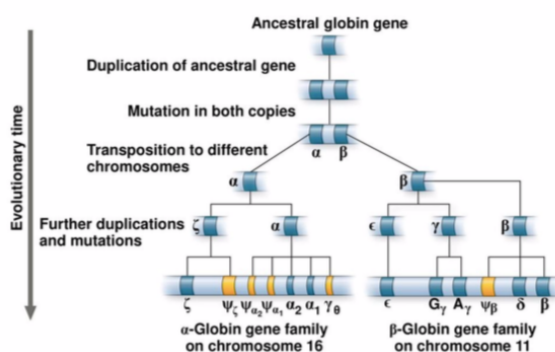
Partie (a) Le génome ancestral avait deux copies d'un gène (A et B) qui étaient des paralogues. À un moment donné, l'espèce ancestrale s'est divisée en deux espèces filles, dont le génome contient chacune deux copies du gène ancestral dupliqué (A1, A2 et B1, B2).

Ces gènes sont tous homologues entre eux. Étant donné que l'événement de duplication qui a créé les gènes A et B s'est produit avant l'événement de spéciation qui a créé les espèces 1 et 2, les gènes A seront des paralogues des gènes B et les gènes 1 seront des orthologues de gènes 2.

Partie (b) Le gène ancestral a été dupliqué uniquement dans la lignée de l'espèce 2.

1.a.2.d. Famille des globines

Famille des globines



Cette image montre l'évolution du gène de la globine.

Cela a commencé comme un gène. En raison de mutations au fil du temps, il est devenu deux gènes de globine. La mutation de ces derniers ensuite a abouti à plus de gènes pour la globine.

Certains gènes sont devenus non-fonctionnels avec le temps.

Cette image montre l'évolution du gène de la globine.

Cela a commencé comme un gène. En raison de mutations au fil du temps, il est devenu deux gènes de globine. La mutation de ces derniers ensuite a abouti à plus de gènes pour la globine.

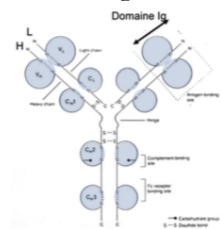
Certains gènes sont devenus non- fonctionnels avec le temps.

1.a.2.e. Superfamilles avec homologie partielle

Superfamilles de gènes (**homologie partielle**, fonction différente ou partiellement conservée)

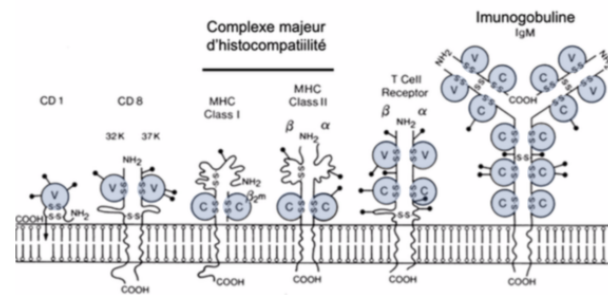
Gènes avec élément structural commun (**exon(s) ou région ancestrales**) mais n'ayant pas la même fonction peuvent faire partie d'une superfamille de gènes. Ex: la superfamille des

Immunoglobulines: **un exon ancestral originel qui code pour le domaine Ig**



- Les domaines Ig sont issus d'un exon ancestral qui a été dupliqué et s'est diversifié
- Les domaines Ig ne sont pas limités aux immunoglobulines mais se retrouvent dans de nombreuses protéines impliquées dans les **interactions cellule-cellule** et dans des mécanismes de reconnaissance moléculaire.
- La caractéristique la plus frappante d'un domaine Ig est une structure secondaire de 110 acides aminés avec un pont disulfure.

1.a.2.e.1. Superfamille des gènes avec domaine Ig



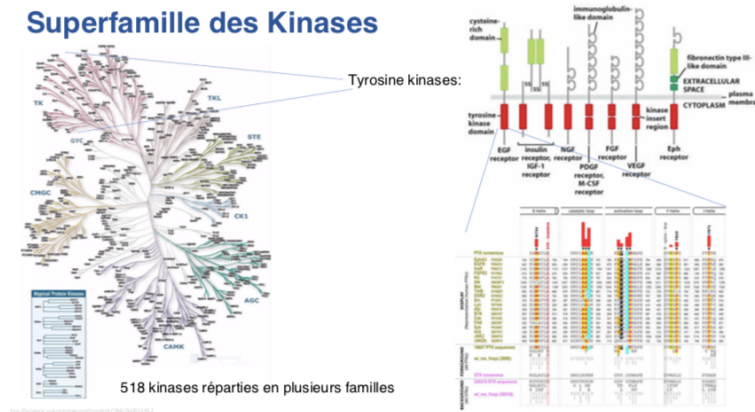
Représentation schématique de certaines protéines de la superfamille des immunoglobulines (Ig). Tous les membres de la superfamille sont impliqués dans la capacité cellulaire à reconnaître d'autres cellules ou particules étrangères.

Ils partagent une **similitude structurelle de base dans le domaine dit Ig** (représenté en bleu), indiquant que les gènes codant pour ces protéines ont évolué à partir d'un gène ancestral commun impliqué dans la reconnaissance de cellule à cellule.

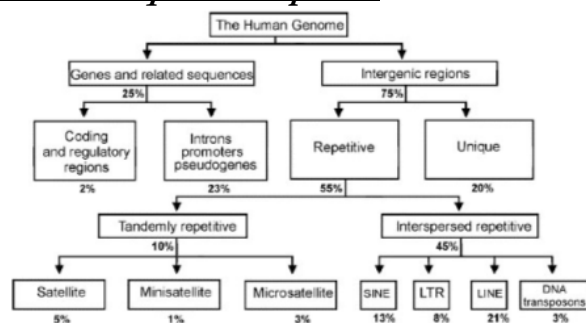
1.a.2.e.2. Superfamille des Kinases

Tyrosine kinases:

518 kinases réparties en plusieurs familles



1.a.2.b. Séquences répétées



- Séquences répétées en tandem:
 - satellites
 - minisatellites
 - microsatellites
- Séquences répétées dispersées:
 - courtes: SINEs
 - longues: LINEs

1.a.2.b.1. Séquences répétées dispersées

Unités répétées individuelles non regroupées mais dispersées en plusieurs régions du génome (retrotransposons: transcriptase inverse)

Séquences LINE : long interspersed nuclear elements (> 1kb) Ex: Line 1 (ou famille Kpn; site de restriction) longueur de 6.1 kb plus une forme de 1.4kb. Nbre de copies: 60- 100'000 copies. Une copie tous les 50kb. Se propage par rétrotransposition via transcriptase inverse

Séquences SINE : short interspersed nuclear elements, Ex: séquence AluI de 280bp contenant un site de restriction pour Alu I; présentes entre 700'000 et un million de fois. spécifique au génome des primates. Se propage par rétrotransposition (via transcriptase inverse codée par les LINE)

1.a.2.b.2. ADN satellite, minisatellite, microsatellite

ADN satellite:

ADN principalement **centromérique** et parfois hétérochromatique.

Bloc de taille finale de 100kb à plusieurs Mb de longueur contenant un **très grand nombre de fois** la même répétition. (Le DNA satellite a une densité différente du reste du DNA).

Minisatellites:

Bloc de taille finale de 0.1 à 20kb contenant des répétitions de 6 nucléotides (TTAGGG) dans les régions télomériques ou de **9 à 24 nucléotides** présents sur tous les chromosomes aussi appelés VNTR (variable number of tandem repeats) **très polymorphiques**.

Peuvent servir de sites préférentiels pour des recombinaisons

Microsatellites:

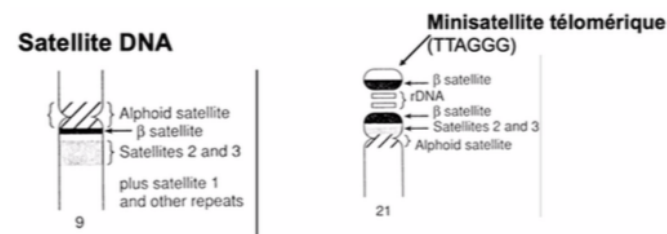
Bloc final <150bp correspondant à des **répétitions de 1 à 4 nucléotides** présent sur tous les chromosomes.

Sont plus dispersés dans le génome que les minisatellites.

1.a.2.b.2.a d'ADN satellites

Exemple:

- L'ADN α -satellite (aussi appelé alphoid DNA en anglais) (AT riche): séquence répétitive de 171 pb présente dans tous les centromères de tous les chromosomes. Correspond à 3-5% du DNA de chaque chromosome.
- Minisatellite télomérique TTAGGG

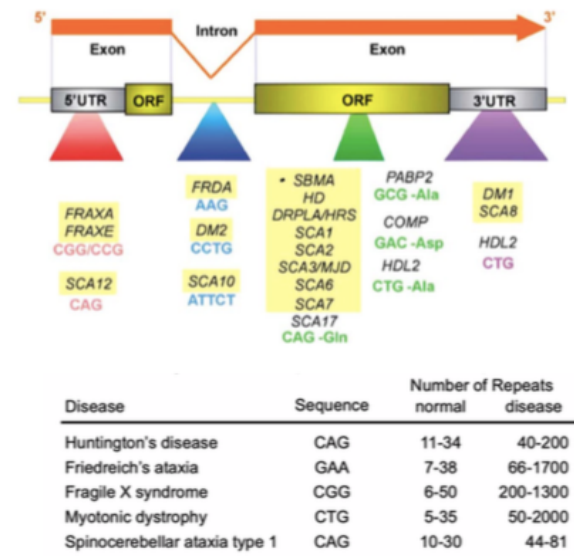


1.a.2.d. Pathologies dues à des répétitions trinuécléotidiques

Les troubles de **répétition des trinuécléotides**, (maladies d'expansion des microsatellites), sont un ensemble de plus de 50 troubles génétiques causés par l'expansion des répétitions de trinuécléotides, une sorte de mutation dans laquelle les répétitions de trois nucléotides augmentent en nombre de copies jusqu'à ce qu'elles franchissent un seuil au-dessus duquel ils deviennent instables .

Une forte expansion de trinuécléotides cause une maladie, tandis qu'une expansion modérée, également appelée «prémuation», a une forte probabilité d'expansion future (instabilité) menant à la présence d'allèles associés à une maladie (mutation complète) dans les générations suivantes. En général, plus l'expansion est importante, plus la maladie se déclare rapidement et plus la maladie devient grave.

Des exemples de telles maladies sont le **syndrome de l'X fragile** (OMIM 309550), la maladie de **Huntington** (OMIM 143100), la **dystrophie myotonique** (OMIM 605377), l'**ataxie spinocérébelleuse** (OMIM 164400, 601517, 607047) ainsi que l'**ataxie de Friedreich** (OMIM 606829).



FRAXA, FRAXE: Syndrome de l'X fragile
SCA12, SCA10, etc.. Ataxie spinocérébelleuse

FRDA : Ataxie de Friedreich

DM2, DM1: Dystrophie myotonique

SBMA: atrophie musculaire spinale et bulbaire

HD: Maladie de Huntington

PABP2: Dystrophie musculaire oculo-pharyngée

COMP: pseudoachondroplasie (cartilage)

HDL: maladie similaire à Huntington

Présents dans les régions codantes, parfois non codantes (régions 5' ou 3' non traduites: rôle dans la stabilité du mRNA et dans sa traduction). En fonction de son emplacement, la répétition trinuécléotidique instable peut provoquer des **défauts dans une protéine** codée par un gène; changer la **régulation de l'expression génique**; produire un **ARN toxique**, une protéine toxique, ou conduire à une **instabilité chromosomique**.

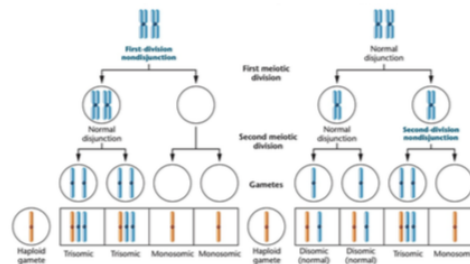
2. Maintien de l'information génétique

Maintien des chromosomes

Mutations au niveau de l'ADN et réparation

2.a. Nombres de Chromosomes:

Term	Explanation
Aneuploidy	$2n \pm x$ chromosomes
Monosomy	$2n - 1$
Disomy	$2n$
Trisomy	$2n + 1$
Tetrasomy, pentasomy, etc.	$2n + 2, 2n + 3$, etc.
Euploidy	Multiples of n
Diploidy	$2n$
Polyploidy	$3n, 4n, 5n, \dots$
Triploidy	$3n$
Tetraploidy, pentaploidy, etc.	$4n, 5n$, etc.
Autopolyploidy	Multiples of the same genome



En cas d'**euploïdie**, des ensembles haploïdes complets de chromosomes sont présents
Dans la condition d'**aneuploïdie**, un organisme gagne ou perd un ou plusieurs chromosomes mais pas un ensemble complet.

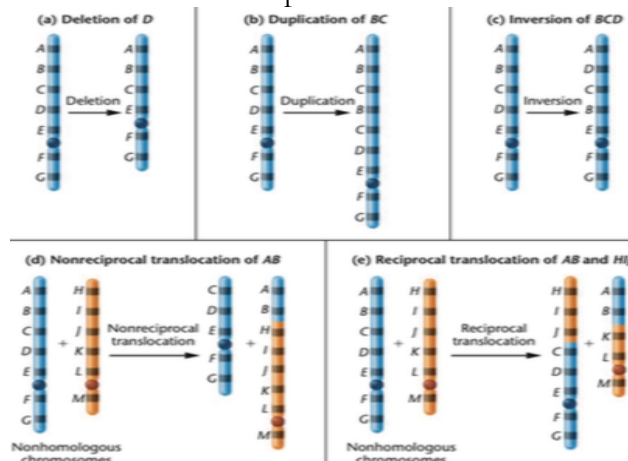
Exemples: trisomie 21, syndrome de Klinefelter (47,XXY), syndrome de Turner (45,X)

Non-disjonction pendant les première et deuxième divisions méiotiques. Après fécondation par un gamète à contenu haploïde normal, des zygotes monosomiques, disomiques (normaux) ou trisomiques sont produits

Essentiellement issue d'une erreur aléatoire lors de la production de gamètes, un phénomène appelée **non-disjonction**, dans laquelle les homologues appariés ne parviennent pas à se disjoindre pendant la ségrégation. Ce processus perturbe la distribution normale des chromosomes en gamètes.

2.a.2. Composition et arrangement des Chromosomes:

Ces aberrations incluent les changements qui suppriment, ajoutent ou réorganisent des parties substantielles d'un ou plusieurs chromosomes.



2.b. Mutations au niveau des gènes:

- Les mutations comprennent tout **changement** dans la séquence de paires de bases de l'ADN.
- Les mutations sont une source de **variation génétique**. Ils sont également la source de dommages génétiques qui contribuent à la mort cellulaire, aux maladies génétiques et au cancer.

- Les mutations ont un large **éventail d'effets** sur les organismes en fonction du type d'altération de la paire de bases, de l'emplacement de la mutation dans le chromosome et de la fonction du produit génique affecté.
- Les mutations peuvent survenir **spontanément** à la suite de processus biologiques et chimiques naturels, ou elles peuvent être **induites** par des facteurs externes, tels que des produits chimiques ou des radiations.
- Les mutations monogéniques provoquent une grande variété de **maladies humaines**.
- Les organismes s'appuient sur un certain nombre de **mécanismes de réparation** de l'ADN pour contrer les mutations. Ces mécanismes vont de la relecture et de la correction des erreurs de réplication à l'excision de base et à la réparation par recombinaison homologue.
- Les mutations dans les gènes dont les produits contrôlent la réparation de l'ADN entraînent une **hypermutabilité du génome**, des maladies de réparation de l'ADN humain et des cancers.
- Les **éléments transposables** peuvent entrer et sortir des chromosomes, provoquant des cassures chromosomiques et induisant des mutations à la fois dans les régions codantes et dans les régions de régulation génique

2.b.1. Classification des mutations

Changement moléculaire:

Mutation **ponctuelle** (changement d'une base)

Mutation **silencieuse** ou neutre : ne change pas l'acide aminé

Mutation **faux-sens**: change l'acide aminé

Mutation **non-sens**: introduit un codon stop

Mutation avec perte du cadre de lecture: La perte ou l'ajout de bases peut aussi provoquer une perte de cadre de lecture (**frameshift**; fs)

Changement de phénotype:

Mutation à **perte de fonction** ou à fonction nulle, (souvent récessive)

Mutation à **gain de fonction** (souvent dominante)

Localisation:

Mutation **somatique**

Mutation **germinale** ou héréditaire

Mutation **liée au chromosome X** (ou Y)

2.b.2. Mutations pendant la réplication

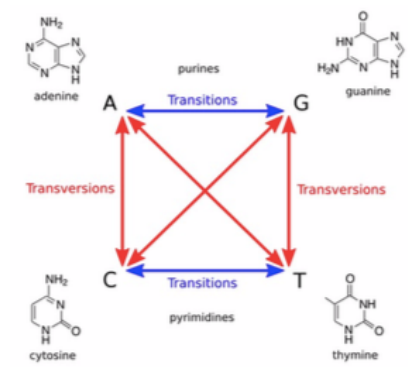
- Les ADN polymérases corrigent la plupart des **erreurs** de réplication en utilisant leur capacité **d'exonucléase**.
- Des nucléotides mal incorporés peuvent **persister** après la réplication. Si ces erreurs ne sont pas détectées et corrigées par des mécanismes de réparation de l'ADN, elles peuvent conduire à des **mutations**.
- Les erreurs de réplication dues à un mauvais appariement conduisent principalement à des mutations ponctuelles. Le fait que les bases puissent prendre plusieurs formes, appelées **tautomères**, augmente le risque de mauvaise appariement lors de la réplication de l'ADN.
- L'exposition à des mutagènes peu augmenter les erreurs spontanées

2.b.3. Transition et transversion

On classe les bases azotées (Adénine, Guanine, Cytosine, Thymines) en 2 familles: **les purines et les pyrimidines**. L'Adénine et la Guanine sont des purines, composées de deux cycles aromatiques.

La Thymines et la Cytosine sont des **pyrimidines** composées d'un seul cycle.

- **Une transition** est une substitution entre deux bases sans changement de famille. C'est à dire une purine qui devient une autre purine, ou alors une pyrimidine qui devient une autre pyrimidine.
- **Une transversion** est associée à un changement de famille. C'est une purine qui se transforme en pyrimidine ou l'inverse.

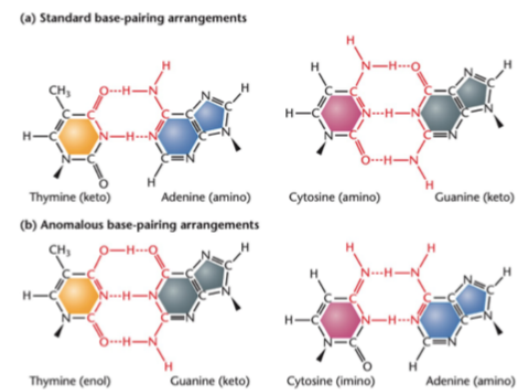


2.b.3. a. Tautomères

Les purines et les pyrimidines peuvent exister sous des **formes tautomères**, (formes chimiques alternatives qui ne diffèrent que par un seul déplacement de proton dans la molécule).

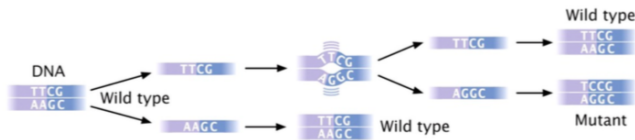
Les tautomères biologiquement importants sont les formes **céto-énol de la thymine et de la guanine** et les formes **amino-imino de la cytosine et de l'adénine**.

Ces déplacements permettant **la liaison hydrogène avec des bases non complémentaires**. Par conséquent, les déplacements tautomères peuvent entraîner des changements et des mutations permanents des paires de bases.



2.b.4. Transmission

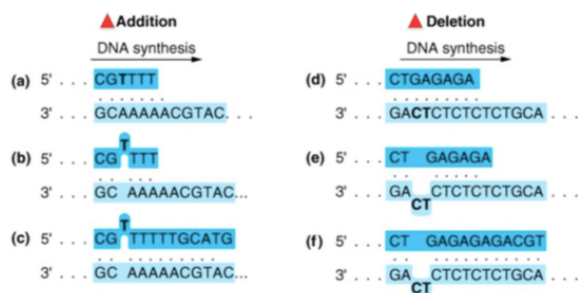
Les Mutations ne **sont pas fixés avant le cycle de réplication suivant** (quand le brin qui a la mutation est utilisé comme matrice!)



2.b.5. Mauvais appariement du brin glissé- slippage

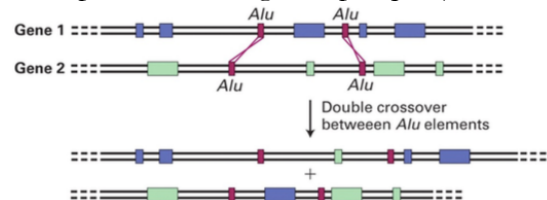
L'appariement de brins glissés, (également connu sous le nom de glissement de réplication), est un processus de mutation qui implique une dénaturation et un déplacement des brins d'ADN, entraînant une **mauvaise appariement des bases complémentaires pendant la réplication**.

Le mauvais appariement des brins glissés est une explication de l'origine et de l'évolution des séquences d'ADN comme l'expansion trinuéclotidique.



2.b.6. Mutation par recombinaison homologue

Exemple d'un échange réciproque (Gène 1 et Gène 2 sont sur des chromosomes différents)

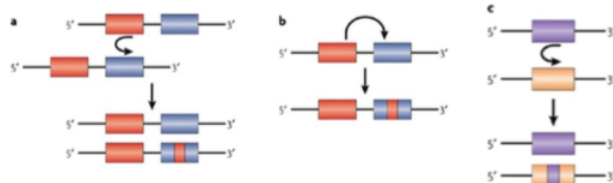


Dans les cellules somatiques, la recombinaison homologue (HR) est un événement rare causé par d'éventuelles cassures double brin de l'ADN (CDB). Les microsatellites sont sujets aux DSB pendant la réplication du génome et, par conséquent, capables de promouvoir la HR.

2.b.7. Mutation par conversion génique

Exemple d'un échange non-réciproque

L'échange peut se faire entre une paire de séquence non allélique, ou entre une paire de séquence allélique (dans ce cas on parle d'une conversion génique interallélique)



a) Conversion de gène **non allélique** (ou interlocus) **en trans**, représentée comme un événement survenant entre des séquences paralogues (représentées par des cases rouges et bleues) qui résident sur des chromatides soeurs ou sur des chromosomes homologues

b) Événements de conversion génique **non alléliques en cis** (entre des copies de gènes non alléliques résidant sur le même chromosome). Les événements de conversion génique, qui sont représentés en a et b, sont pratiquement indiscernables les uns des autres.

c) Événements de conversion **génique interalléliques** se produisant entre les allèles (représentés en violet et orange) qui résident sur des chromosomes homologues.

2.b.8. Mutation par éléments mobiles (transposons)

~ 50% du génome humain est dérivé de transposons comme les LINEs et SINEs.

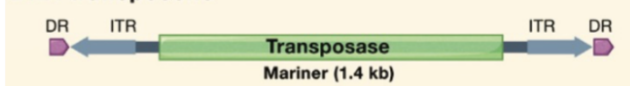
La plupart sont inactifs mais leur mobilité peut causer des mutations

TABLE 15.5 Transposable Elements in the Human Genome

Element Type	Length	Copies in Genome	% of Genome
LINEs	1-6 kb	850,000	21
SINEs	100-500 bp	1,500,000	13
LTR Elements	<5 kb	443,000	8
DNA Elements	80-300 bp	294,000	3
Unclassified	—	3,000	0.1

2.c. Transposons chez les mammifères type II

DNA transposons



Les éléments de classe II ou transposons d'ADN représentent environ 3% du génome humain et la plupart se déplacent par un mécanisme de «copier-coller». **Aucun transposon d'ADN actuellement actif n'a été identifié chez les mammifères.**

Abréviations: DR, répétition directe; ITR, répétition terminale inversée;

Les éléments transposables (ET) les plus communément actifs chez l'homme sont les rétrotransposons de type **non-LTR** (*non-long terminal repeat*) appartenant aux ET à ARN intermédiaire.

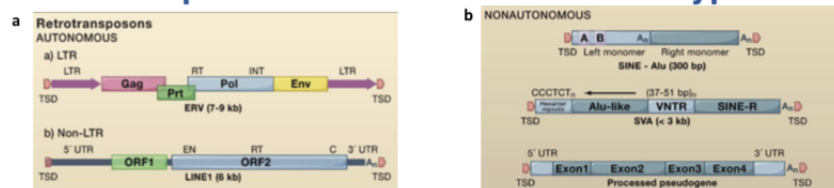
Ils sont subdivisés en **éléments longs** (**LINE** [*long interspersed repetitive element*] ou L1) et **courts** (**SINE**, *small interspersed repetitive element*).

Ces derniers sont divisés en deux sous-classes, les séquences Alu et les SVA (d'après *Sine*, VNTR [*variable number of tandem repeats*] and *Alu*)

2.c.1. Retrotransposons chez les mammifères type I

Les éléments de classe I comprennent trois groupes, tous se déplaçant de manière «copier-coller» impliquant la transcription inverse d'un ARN intermédiaire et l'insertion de sa copie d'ADNc à un nouveau site dans le génome.

Retrotransposons chez les mammifères type I



- a) **Les rétrotransposons** qui contiennent beaucoup, mais pas toutes, des activités nécessaires à leur mobilité sont appelés **autonomes**. Ce sont des rétrovirus endogènes (ERV) et des LINE. **La LINE1** est la seule LINE connue pour être activement mobile chez les espèces euthériennes.
- b) **Les éléments non autonomes**, tels que les Alus, dépendent de LINE1 pour leur mobilité. Les pseudogènes affectés sont des ARNm épissés copiés et insérés dans le génome par les LINE1.

Abréviations :

Gag, (protéines de capsid);

Prt, protéase;

Pol, polymérase;

Env, enveloppe;

RT, domaine de transcriptase inverse;

INT, domaine de l'intégrase;

TSD, duplica(on du site cible;

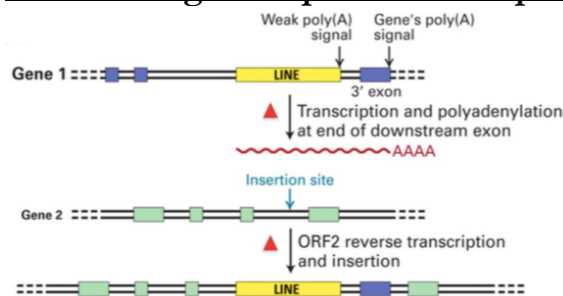
LTR, longue répétition terminale;

EN, domaine d'endonucléase;

An, poly (A); A- et B-box , promoteur;

VNTR, répétitions en tandem à nombre variable

2.b.9. Mutagenèse par rétrotransposition



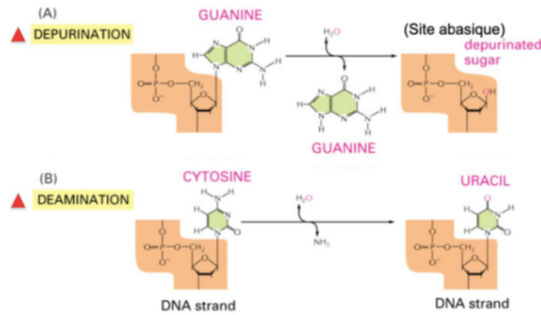
2.b.10. Mutagenèse par agents chimiques ou physiques

Par traitement avec des agents **mutagènes spécifiques** ou des analogues des bases ou des agents physiques comme les **UV** on peut générer:

- de mauvais appariements,
- des désaminations,
- des dépurinations
- des dimères de pyrimidines (thymidines ou cytosines).

2.b.10.a. Dépurination and Désamination

Courantes spontanées ou induites:

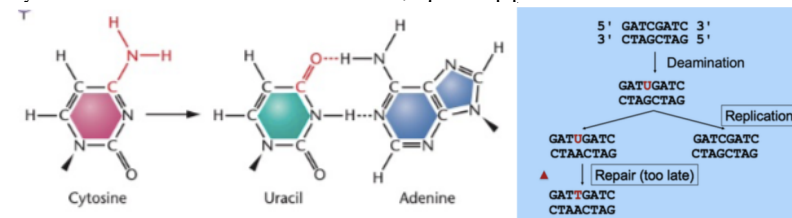


(A) dépurination : coupure de la liaison β -N-glycosidique (ions H^+) dans une cellule humaine
5'000 purines sont perdues par jour

(B) désamination: C $\rightarrow$ U et mC $\rightarrow$ T. Dans une cellule humaine 100 bases par jour sont déaminées

2.b.10.a.1. Désamination non réparée d'une cytosine

Désamination de la cytosine conduisant à de nouveaux appariements et mutations de bases. La cytosine est convertie en uracile, qui s'apparie à l'adénine.

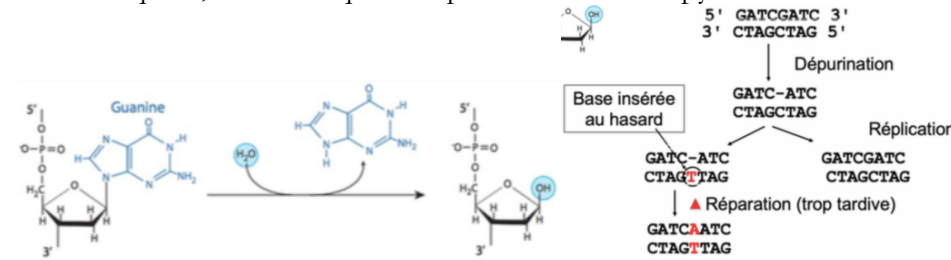


2.b.10.a.2. Dépurination non réparée

Dépurination: atteinte la plus courante à l'ADN des organismes vivants, la liaison β -N-glycosidique entre une adénine ou guanine et le désoxyribose est hydrolysée.

La dépyrimidination des résidus de cytosine et de thymine se produit à un rythme plus lent. Malgré le taux élevé de perte de ces bases, elles sont généralement corrigées par la **réparation par excision de base (BER)**.

Par conséquent, il est rare que la dépurination ou la dépyrimidination entraîne une mutation.

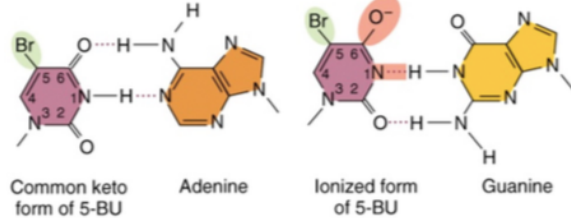


2.b.10.b. Exposition à des analogues de bases

Ces molécules chimiques peuvent remplacer les purines ou les pyrimidines lors de la biosynthèse des acides nucléiques.

Le 5-bromouracile (5-BU), se comporte comme **un analogue de la thymine** mais est halogéné à la position 5 du cycle pyrimidine. L'atome de brome augmente la probabilité qu'un déplacement tautomérique se produise.

⇒ 5-BU:::G => transition A::T vers G::C.

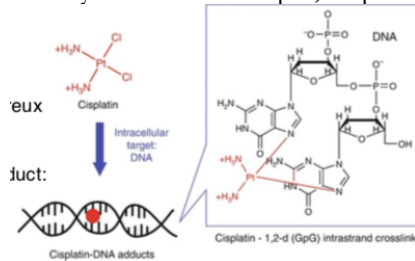


La présence de 5-BU dans l'ADN **augmente la sensibilité** de la molécule aux UV.

La 2-aminopurine (2-AP) peut agir comme un analogue de l'adénine. En plus de son affinité d'appariement de bases avec la thymine, le 2-AP peut également s'apparier avec la cytosine, conduisant à d'éventuelles transitions de A ::T à G::C après réplication.

2.b.10.c. Autres agents chimiques

- Acide nitreux: transition AT --> GC par déamination des bases
 - A --> Hypoxanthine qui s'apparie avec C
 - C --> Uracil qui s'apparie avec A
 - G --> Xanthine qui s'apparie avec C (pas d'effet)
 - T n'a pas de -NH₂ donc pas d'effet de l'acide nitreux
- Reactive Oxygen Species (ROS):H₂O₂(ex:base adduct: oxyguanosine)
- Bulky adducts: exemple, cisplatine (antitumeur) se lie à l'ADN => frameshifts



2.b.10.d Autres agents physique: UV

Un effet majeur du rayonnement UV sur l'ADN est la création de **pyrimidine dimères** - constituées de deux pyrimidines identiques - en particulier celles constituées de **deux résidus thymine**

Une heure d'exposition au soleil induit 80'000 dimères de thymidine par cellule



Les dimères **déforment la conformation de l'ADN** et inhibent la réplication normale => erreurs dans la séquence lors de la réplication

2.d. Mécanismes de réparation

o Réparation pendant la réplication (mismatch)

o Directe et spécifique:

- Photolyase (phrA/phrB system)(TT)

o En plusieurs étapes:

- Réparation par **excision de la Base** BER: déamination; dépurination (site abasique); base adduct; single stranded break)
- Réparation par **excision de nucléotides** NER
- Réparation **mismatch repair**
- Réparation de **mutation par recombinaison homologue** (déstabilisation de la double hélice: ex liaison covalente entre les brins complémentaires)
- Réparation de **cassure de doubles brins par recombinaison** homologue
- Réparation de **cassures de doubles brins par fusion** (NHEJ)

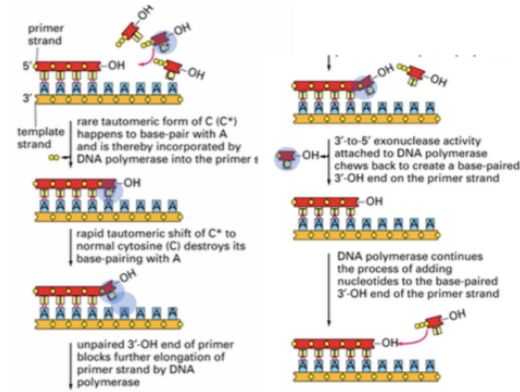
2.d.1. Réparation pendant la réplication (mismatch)

Activité de correction des DNA polymerases

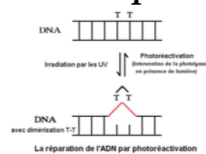
Les DNA polymérase cellulaires sont souvent très fidèles (activité de correction d'épreuves ou proofreading).

Elles peuvent vérifier la base précédente avant d'ajouter un nouveau nucléotide. Si la base précédente est mal appariée, elle est enlevée grâce à l'activité exonucléase 3' -> 5' (= 5' -> 3'!)

Taux d'erreur : 1 / 10⁶ à 1 / 10¹⁰ paires de bases par réplication.



2.d.2. Réparation directe post-réplication (photoréactivation)



Réparation des dimères de thymine (cytosine) mécanisme important pour les bactéries; **pas** présent chez l'homme

Le processus dépend de l'activité d'une protéine appelée **enzyme de photoréactivation**.

Le mode d'action de l'enzyme est de couper les liaisons entre les dimères de thymine, **inversant ainsi directement l'effet du rayonnement UV** sur l'ADN

2.d.3. Bases excision repair

Réparation par Bases excision

- Une **glycosylase spécifique** élimine la base endommagée ou inappropriée
- Une **endonucléase** entaille le squelette sucre-phosphate: l'endonucléase AP
- Une **ADN polymérase** incorpore une base correcte (parfois une seule base est ajoutée, parfois jusqu'à 6 sont ajoutées)
- Une **ADN ligase** scelle le squelette sucre- phosphate

Utilisé pour réparer la cytosine et d'autres désaminations; dépurination; ajout de base; rupture simple brin [SEP]



Réparation par excision de base (BER) réalisée par l'uracile ADN glycosylase, ap endonucléase, ADN polymérase et ADN ligase.

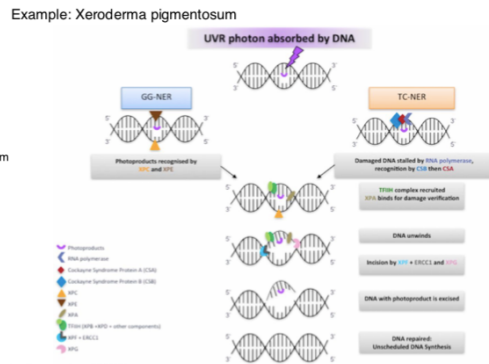
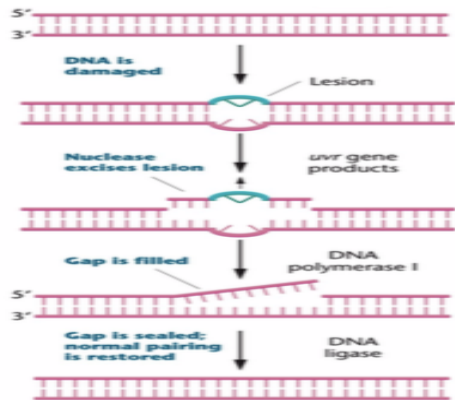
L'uracile est reconnu comme une base non complémentaire, excisé et remplacé par la base complémentaire (C)

2.d.4. Nucléotide excision repair

Réparation par **excision de nucléotides** NER

- Une **endonucléase d'excision** entaille le brin endommagé en deux sites distants de 10-30 bases
- Une **hélicase** supprime la section endommagée
- Une **ADN polymérase** resynthétise la section manquante section
- Une **ADN ligase** lie le sucre-phosphate

Utilisé pour réparer les dimères de pyrimidine, les bulk adducts



Réparation par excision nucléotidique (NER) d'un dimère de thymine induit par les UV. Lors de la réparation, 13 nucléotides sont excisés chez les procaryotes, et 28 nucléotides sont excisés chez les eucaryotes.

2.d.4.a. Défaut dans NER chez l'homme

Exemple: Xeroderma pigmentosum
maladie autosomique récessive rare,

caractérisée par un défaut de la réparation par excision NER et des tumeurs fréquentes, résultant de mutations "perte-de-fonction" dans les gènes codant pour les protéines de réparation.

les patients avec XP sont extrêmement sensibles aux rayons UV. De plus, ils ont un taux de cancer 2000 fois plus élevé (cancer de la peau)

La figure représente un schéma pour NER, montrant **uniquement les rôles des protéines XP**.

Dans **GG-NER**, XPE et XPC sont impliqués dans la reconnaissance des dommages, XPB et XPD contenant du TFIIH sont recrutés et ouvrent la structure de l'ADN à proximité des dommages. XPA vérifie la structure endommagée avant les doubles incisions par XPF-ERCC1 et XPG. Une fois la section endommagée retirée, les ADN polymérases et ligases comblent le vide.

Dans **TC-NER**, le blocage de l'ARN polymérase par le dommage est le signal de reconnaissance. Les protéines CSB et CSA, défectueuses dans le syndrome de Cockayne, sont recrutées, et celles-ci recrutent à leur tour TFIIH pour permettre au reste du processus de NER de se poursuivre.

2.d.5. Mismatch Repair (MMR)

Réparation **mismatch repair**

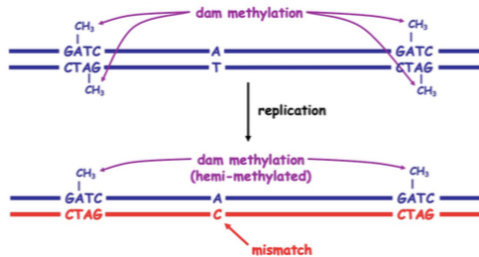
Pour faire face aux erreurs (mauvaise appariements, petites insertions, suppressions) qui **subsistent après la réplication**, un autre mécanisme, appelé réparation des incompatibilités (MMR), peut être activé.

Pendant la MMR, les mésappariements sont détectés, le nucléotide incorrect est supprimé et le nucléotide correct est inséré à sa place.

Comment le système de réparation reconnaît-il quel nucléotide est correct (sur le brin matrice) et quel nucléotide est incorrect (sur le brin nouvellement synthétisé)? **La discrimination des brins est une étape critique.**

La perte de MMR entraîne un phénotype mutateur, qui provoque une prédisposition au cancer.

2.d.5.a. Mismatch Repair (MMR) chez les bactéries



Chez les **bactéries gram négatif**, l'hémiméthylation transitoire distingue les brins (le parent est méthylé et la fille ne l'est pas).

Cependant, chez d'autres procaryotes et eucaryotes, le mécanisme exact n'est pas clair.

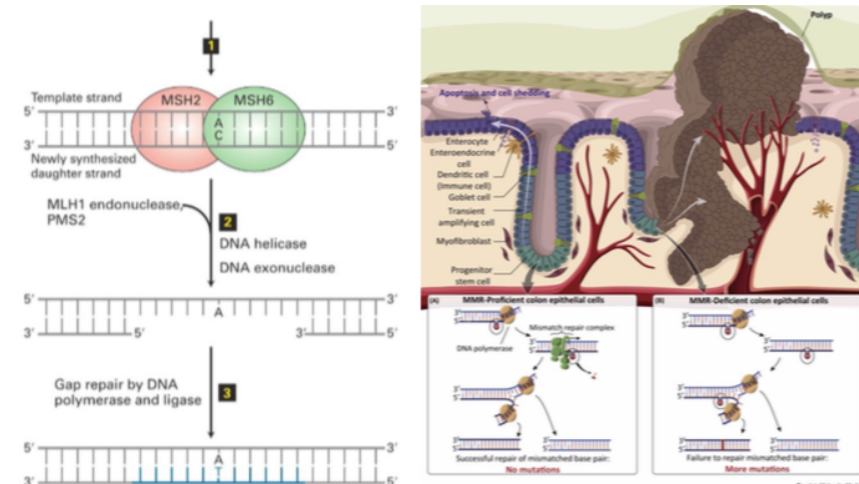
On soupçonne que, chez les eucaryotes, **l'ADN du brin tardif** nouvellement synthétisé contient de manière transitoire des entailles (avant d'être lié par l'ADN ligase) et fournit un signal qui dirige les systèmes de relecture des mésappariements vers le brin approprié.

2.d.5.b. Mismatch Repair (MMR) mécanismes

La **reconnaissance des mésappariements** ou des bases modifiées chimiquement est médiée par les protéines MSH2 et MSH6 qui forment le complexe MutS α .

Dans l'étape suivante, **le brin fille est identifié** par des cassures monocaténares non ligaturées. Le complexe MutL α (MLH1-MLH2) s'associe au MutS α ,

l'excision est réalisée par l'exonucléase I, la la séquence est complétée et la ligaturée par l'ADN polymérase δ



2.d.5.c. Mismatch Repair (MMR) and colorectal cancer

Le **cancer du côlon héréditaire sans polypose (HNPCC)**, la forme la plus courante de cancer héréditaire du côlon, est un syndrome de réparation des mésappariements d'ADN (MMR) déficiente.

Des gènes MMR humains ont été identifiés qui, lorsqu'ils sont mutés dans la lignée germinale, provoquent une susceptibilité à ce syndrome.

A ce jour, plus de 300 mutations prédisposantes différentes sont connues, affectant principalement les gènes MLH1 (50%), MSH2 (~40%) et MSH6 (~10%).

Les individus génétiquement prédisposés portent une copie défectueuse d'un gène MMR dans chaque cellule.

2.d.6. La Recombinaison homologue

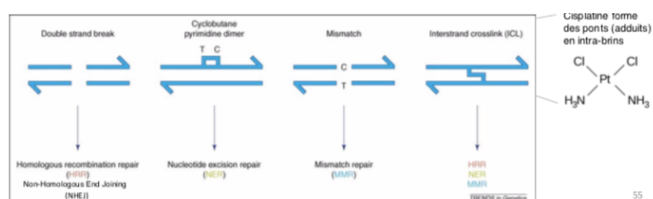
Réparation de **mutation par recombinaison homologue** (déstabilisation de la double hélice: ex liaison covalente entre les brins complémentaires)

Correspond à une recombinaison génétique entre deux séquences identiques situées sur **2 molécules d'ADN** différentes, ou distantes l'une de l'autre sur la même molécule. (Certain ARN de virus font la RH)

réparer avec précision les **cassures** qui se produisent sur les deux brins d'ADN, cassures double brin (CDB), dans un processus appelé réparation par recombinaison homologue (HRR).

réparer des **liaisons intra-brins**

produit également de **nouvelles combinaisons de séquences d'ADN pendant la méiose**, le processus par lequel les eucaryotes fabriquent des cellules gamètes => évolution.

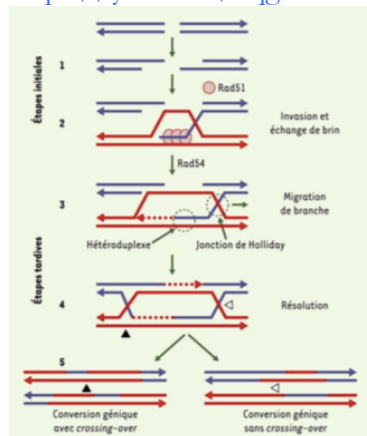


2.d.7. Réparation d'une cassure double brin (CDB) par recombinaison homologue

Réparation de **cassure de doubles brins par recombinaison** homologue

- 1) La CDB est métabolisée par une **exonucléase** qui produit des queues simple brin.
- 2) L'ADN **sb envahit un ADN duplexe homologue** intact (chromatide sœur). - > séquences homologues, deux séquences non parfaitement homologues crée une molécule hybride porteuse de mésappariements de base, appelée **hétéroduplexe**, qui peut être prise en charge par le MMR. Les jonctions cruciformes (**jonctions de Holliday**) peuvent migrer (migration de branche), permettant ainsi l'élongation de la molécule hétéroduplexe.
- 3) Une **polymérisation** est déclenchée en utilisant **l'extrémité 3'** du brin envahisseur comme amorce. Le brin d'ADN intact déplacé par la synthèse s'hybride alors avec la queue simple brin complémentaire.
- 4) Les brèches simple brin sont comblées par la polymérisation.
- 5) La conversion génique (transfert non réciproque d'information génétique) dépend de l'orientation de la réparation des mésappariements et de la séquence copiée dans la région de la CDB. Les jonctions de Holliday peuvent être résolues selon deux orientations alternatives (triangles noir ou blanc) associés ou non à un crossing-over (échange réciproque d'information génétique)

<https://youtu.be/3qgBKrAZCLg>



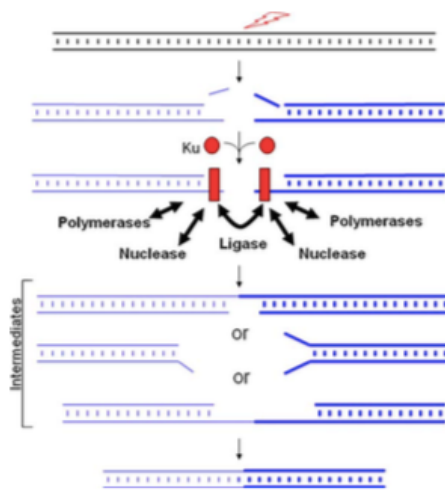
La recombinaison homologue source de variations

Dans les **cellules somatiques**, la HR est rare causée par d'éventuelles cassures double brin de l'ADN (CDB). - > conduit fréquemment à une recombinaison non croisée et a des effets néfastes potentiels dus à la perte d'hétérozygotie (LOH)

En revanche, les **cellules germinales** présentent une fréquence élevée des CDB programmées. Ce qui favorise le brassage génétique.



2.d.8. La Réparation de cassures de doubles brins par fusion Non-Homologous End Joining (NHEJ)



Réparation de cassures de doubles brins par fusion (NHEJ)

(Double Strand Breaks: radiations ionisantes, molécule anti-cancéreuse comme bléomycine, ROS)

La **jonction d'extrémités non homologues** (Non-Homologous End-Joining ou NHEJ) est un mécanisme de réparation de l'ADN qui permet de réparer des cassures double brin (CDB). C'est un mécanisme **non-conservatif** (contrairement par exemple à la HR) il ne restaure pas la séquence mais seulement la continuité de l'ADN.

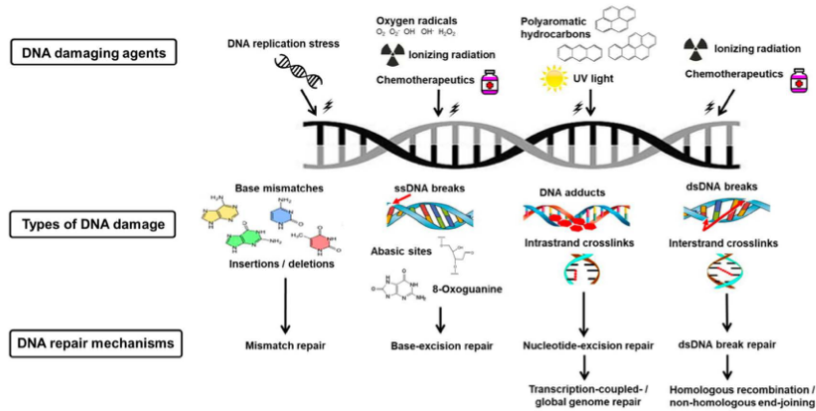
Cette réparation conduira ainsi au changement de l'information génétique, en général une délétion, et donc possiblement à

l'apparition d'une mutation pour le gène concerné si la cassure survient à l'intérieur d'un gène.

Cette réparation est possible grâce à l'intervention de la protéine **Ku** (dimère entre deux sous-unités : Ku70 et Ku80) qui

va interagir avec les deux extrémités d'ADN résultant de la cassure. Cette protéine va ensuite agir par essais et erreurs pour tenter d'établir une interaction transitoire entre les deux extrémités d'ADN.

2.e. Réparations principales



2.e.1. Les défauts dans la réparation causent des maladies

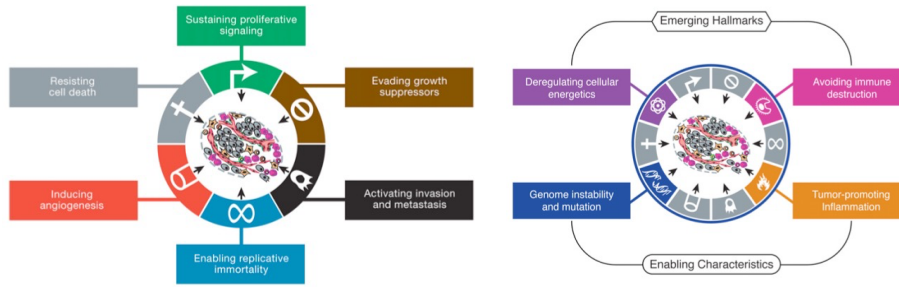
Base excision repair	Mismatch repair	Nucleotide excision repair	Homologous recombination	Nonhomologous end joining	Interstrand cross-link repair
Clinical features Neurodegeneration	Cancer	Cancer Hypogonadism Neurodegeneration Pigmentation changes Short stature UV light sensitivity	Cancer Microcephaly Neurodegeneration Pigmentation changes Short stature Skeletal changes X-ray sensitivity	Anemia Immunodeficiency Microcephaly Short stature Skeletal changes X-ray sensitivity	Anemia Cancer Hypogonadism Immunodeficiency Microcephaly Hepatosplaty Short stature Skeletal changes
DNA lesion example 8-Oxoguanine	G-A mispair	6,4 Photoproduct	Double-strand DNA break		Acetaldehyde cross-link

2.e.2. Les défauts dans la réparation héréditaires

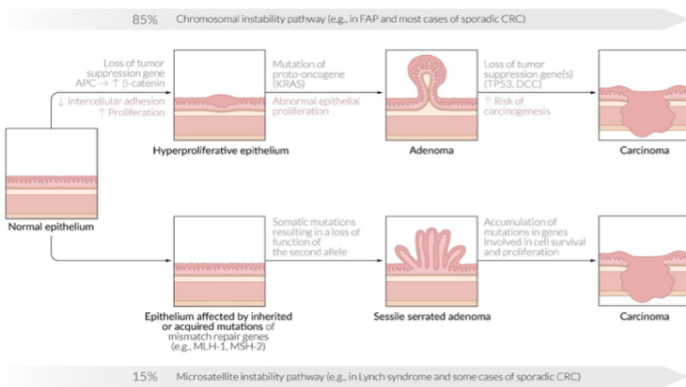
Disease	DNA-Repair System Affected	Sensitivity	Cancer Susceptibility	Symptoms
PREVENTION OF POINT MUTATIONS, INSERTIONS, AND DELETIONS				
Hereditary nonpolyposis colorectal cancer	DNA mismatch repair	UV irradiation, chemical mutagens	Colon, ovary	Early development of tumors
Xeroderma pigmentosum	Nucleotide excision repair	UV irradiation, point mutations	Skin carcinomas, melanomas	Skin and eye photosensitivity, keratoses
REPAIR OF DOUBLE-STRAND BREAKS				
Bloom's syndrome	Repair of double-strand breaks by homologous recombination	Mild alkylating agents	Carcinomas, leukemias, lymphomas	Photosensitivity, facial telangiectases, chromosome alterations
Fanconi anemia	Repair of double-strand breaks by homologous recombination	DNA cross-linking agents, reactive oxidant chemicals	Acute myeloid leukemia, squamous-cell carcinomas	Developmental abnormalities including infertility and deformities of the skeleton; anemia
Hereditary breast cancer, BRCA-1 and BRCA-2 deficiency	Repair of double-strand breaks by homologous recombination		Breast and ovarian cancer	Breast and ovarian cancer

SOURCES: Modified from A. Kornberg and T. Baker, 1992, *DNA Replication*, 2d ed., W. H. Freeman and Company, p. 788; J. Hoesjmakers, 2001, *Nature* 411:366; and L. Thompson and D. Schild, 2002, *Mutation Res.* 509:49.

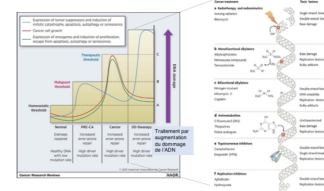
2.e.3. Les tissus cancéreux accumulent des défauts dans plusieurs voies.



2.e.3.a. Accumulation de mutations dans le cancer du colon

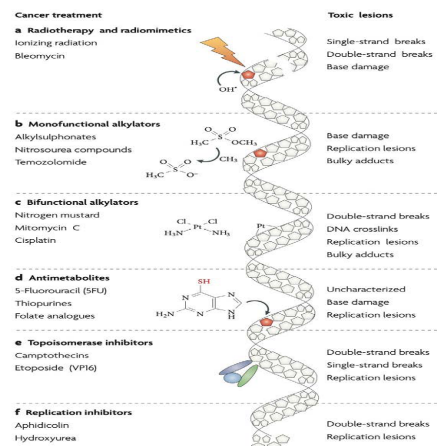
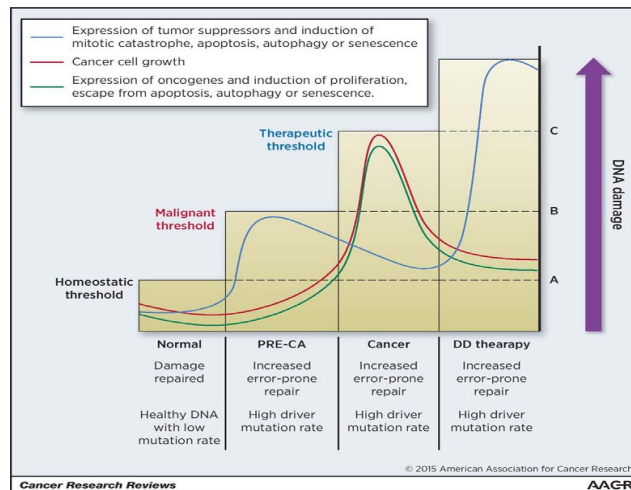


Traitement par augmentation du dommage de l'ADN



2.e.3.b Traitement par augmentation du dommage de l'ADN

Traitement par augmentation du dommage de l'ADN



3. Les outils de la biologie moléculaire

- Génie génétique : Ensemble des **outils et des techniques de la biologie moléculaire** permettant, de manière **contrôlée**, l'étude de la modification des gènes : leur isolement, leur clonage, leur séquençage, leur découpage ...**dans un but de recherche fondamentale ou appliquée**.
- Permet la **modification du patrimoine génétique** d'un organisme vivant de façon temporaire ou permanente.
 - Enzymes de restriction
 - Electrophorèse du DNA et cartes de restriction
 - Hybridation selon Southern
 - Clonagemoléculaire
 - PCR et séquençage du DNA
 - Applications du génie génétique
 - Introduction à la génomique

3.a. Enzymes de restriction

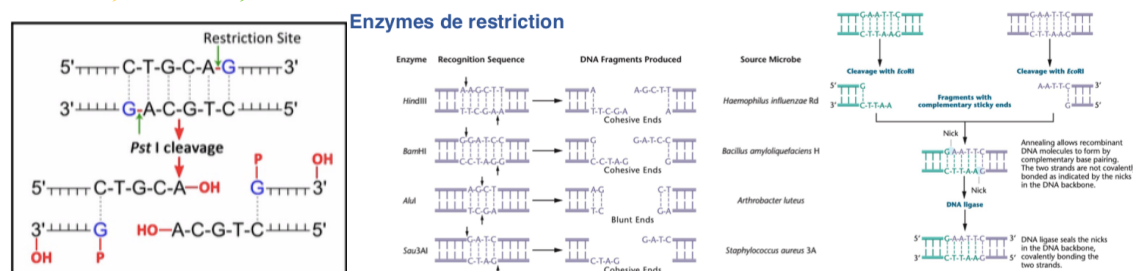
Enzymes de restriction (ou nucléase de restriction) : Les enzymes de restriction sont **produites par les bactéries** comme mécanisme de défense contre l'infection par bactériophage (virus).

Ils protègent contre l'infection virale en dégradant l'ADN des virus envahisseurs.

Plus de **3 500 enzymes de restriction ont été identifiées** et plus de 250 sont produites dans le commerce et disponibles pour une utilisation par les chercheurs.

Une enzyme de restriction reconnaît et se lie à l'ADN au niveau d'une séquence nucléotidique **spécifique** appelée séquence de reconnaissance ou **site de restriction** (souvent **palindromique**)

SUGUS, XANAX, RESSASSER



Les enzymes de restrictions et une ligase permettent de 'copier coller' des ADN de sources diverses

3.a.1 Les cartes de restrictions

L'établissement d'une carte de restriction permet de **localiser les sites de clivage** des enzymes de restriction sur le DNA.

Elle nécessite la mesure de la longueur des fragments de DNA par :

Electrophorèse :

Séparation de molécules chargées par migration dans un gel sous l'effet d'un champ électrique. La distance de migration des fragments d'acides nucléiques est inversement proportionnelle au logarithme de leur taille.

Détermination d'une carte de restriction :

Détermination des sites de coupure sur le DNA avec un ou plusieurs enzymes de restriction et localisation des sites de restriction.

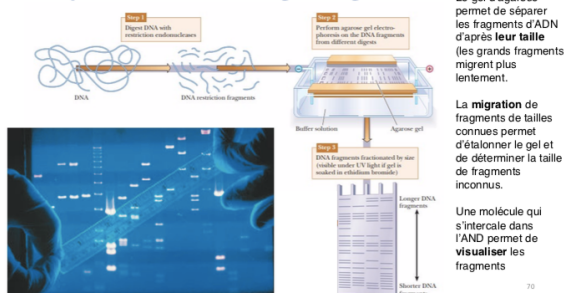
3.b. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Le gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN d'après leur taille (les grands fragments migrent plus lentement).

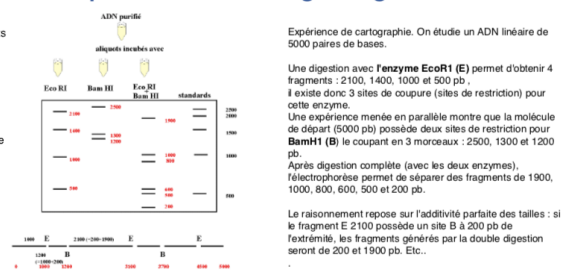
La **migration** de fragments de tailles connues permet d'étalonner le gel et de déterminer la taille de fragments inconnus.

Une molécule qui s'intercale dans l'AND permet de **visualiser** les fragments

Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose



Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose



Expérience de cartographie. On étudie un ADN linéaire de 5000 paires de bases.

Une digestion avec l'enzyme **EcoRI (E)** permet d'obtenir 4 fragments : 2100, 1400, 1000 et 500 pb, il existe donc 3 sites de coupure (sites de restriction) pour cette enzyme.

Une expérience menée en parallèle montre que la molécule de départ (5000 pb) possède deux sites de restriction pour **BamHI (B)** le coupant en 3 morceaux : 2500, 1300 et 1200 pb.

Après digestion complète (avec les deux enzymes), l'électrophorèse permet de séparer des fragments de 1900, 1000, 800, 600, 500 et 200 pb.

Le raisonnement repose sur l'additivité parfaite des tailles : si le fragment E 2100 possède un site B à 200 pb de l'extrémité, les fragments générés par la double digestion seront de 200 et 1900 pb. Etc..

3.c. Hybridation selon Southern

Hybridation selon Southern (Southern blot) :

Détection d'une **séquence de DNA particulière** dans une collection de fragments de restriction séparés par électrophorèse.

Méthode basée sur l'**appariement** (hybridation moléculaire) d'un brin de DNA marqué connu, la **sonde**, avec sa **séquence complémentaire** sur un des brins d'un fragment de restriction.

Cette technique est aussi appliquée sur des chromosomes intacts (hybridation in situ) en cartographie physique



3.c.1. Southern blot

(également appelé transfert d'ADN ou buvardage de Southern)

Des **fragments d'ADN** obtenus par les enzymes de restriction. L'ADN est migré sur un gel

Puis, **transféré** sur une membrane par capillarité

On applique la technique du transfert de Southern pour **fixer les sondes** aux fragments leur correspondant

Les sondes sont **révélées**.

Le Southern blot

permet par exemple de détecter de **petites mutations ponctuelles**, délétions, inversions, **lorsqu'elles affectent la présence ou la longueur d'un fragment de restriction** : détection de RFLP (restriction fragment length polymorphism), en génétique des populations, diagnostique génétique ou médecine légale/police scientifique.

(a) gel d'agarose coloré avec du bromure d'éthidium pour montrer des fragments d'ADN (forme un dégradé car de nombreux fragments)

(b) un film radiographique exposé d'un Southern blot préparé à partir du gel dans la partie (a).

seulement les séquences d'ADN complémentaires de la sonde montrent une hybridation.

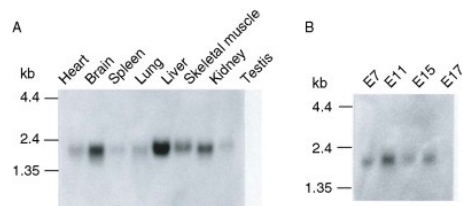
3.c.1.a. Northern blot

Le Northern blot dérive du Southern blot, sauf qu'au lieu d'étudier de l'ADN, on étudie de **l'ARN**.

L'ARN va être analysé par **électrophorèse**, permettant de séparer les ARN en fonction de leur taille. Puis ils sont détectés par une **sonde**.

Comme dans le transfert de Southern, la sonde d'hybridation peut être faite à partir d'ADN ou d'ARN.

Analyse par transfert de Northern de GlcAT-I de souris. Des transferts de Northern avec des **ARNm provenant de divers tissus de souris** (A) ou stades embryonnaires à différents jours embryonnaires (B) ont été hybridés avec une sonde pour l'ADNc de GlcAT-I de souris.



Mise en application: RFLP (restriction fragment length polymorphism)

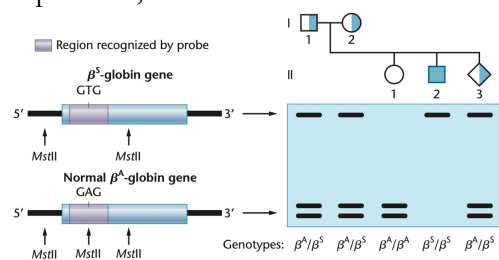
L'analyse du variant grace longueur du fragment de restriction (RFLP), est une méthode classique de test génétique

Diagnostic de la **drépanocytose** par RFLP. dans l'allèle mutant β -globine (β^S), la mutation (GAG $\rightarrow$ GTG) a détruit un site de restriction pour MstII. Cette mutation donne un seul grand fragment sur un transfert de **Southern** (avec la **sonde** en violet).

Au lieu de deux fragment plus petits dans le cas non muté.

Le génotype de chaque membre de la famille peut être déduit et est indiqué sous chaque ligne.

Les techniques utilisant la PCR et au séquençage ont largement remplacé l'analyse par RFLP. Cependant, la RFLP est encore utilisée occasionnellement en clinique.



3.d. Clonage moléculaire

3.d.1. Crispr/Cas9 : une révolution récente

Le système CRISPR-Cas9, est utilisé comme **ciseau moléculaire** afin d'introduire des modifications locales du génome (manipulations souvent qualifiées d'édition génomique) de cellules ou de nombreux organismes modèles.

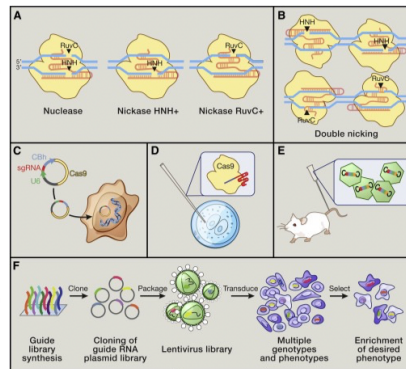
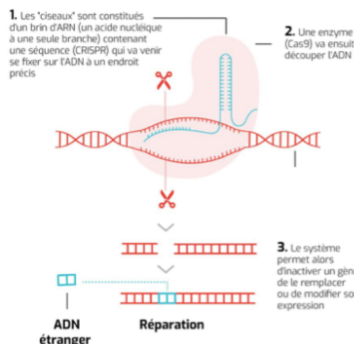
Identifier 20 paires de bases qui correspondent à un gène que vous souhaitez modifier.

Une molécule d'ARN complémentaire à ces 20 paires de bases est construite.

Ensuite, l'ARN plus la protéine [Cas9] coupera (CDB) - comme une paire de ciseaux - l'ADN à ce site

Non-Homologous End Joining (NHEJ) répare et introduit des mutations qui détruisent le cadre de lecture.

UNE TECHNIQUE QUI DÉCOUPE L'ADN POUR MIEUX LA RÉPARER



- Rapide
- Simple
- Efficace

un outil aux applications multiples

- A) La nucléase Cas9 clive l'ADN des **CDB** à extrémités franches. Une version peu faire des cassures d'ADN **simple brin**.
- B) Coupure simple brin coopératives, doublant la longueur de la reconnaissance de la cible sans sacrifier l'efficacité du clivage.
- C) Les plasmides d'expression codant pour le gène Cas9 et une courte cassette sgRNA peuvent être **directement transfectés** dans des lignées cellulaires d'intérêt.
- D) La protéine Cas9 purifiée et le sgRNA transcrit in vitro peuvent être micro-injectés dans des zygotes fécondés pour la **génération rapide de modèles animaux transgéniques**.
- E) Pour la modification génétique somatique, **des vecteurs viraux** à titre élevé codant pour les réactifs CRISPR peuvent être transduits dans des tissus ou des cellules d'intérêt.
- F) Le **criblage fonctionnel à l'échelle du génome** peut être facilité par la synthèse de masse et la livraison de bibliothèques d'ARN guides.

3.e. PCR et séquençage du DNA - Polymerase chain reaction (PCR)

Réaction en chaîne par polymérase

Permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'AND (ou ARN) connue.

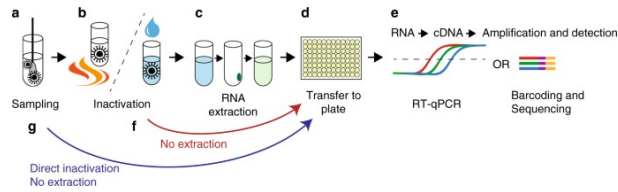
3.e.1. PCR - Utilise:

une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence spécifique d'ADN

(l'amplicon))

Des amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides.

On peut ainsi, par exemple, détecter la présence du SARS-Cov2 dans les eaux usées ou des traces d'OGM (organismes génétiquement modifiés) dans les aliments.



3.e.2. Principe de la PCR

Une réaction d'amplification d'ADN par PCR contient les composés suivants:

- L'échantillon contenant l'ADN à amplifier (**ADN matrice**, amplicon).
- Une **amorce** (oligonucléotide 1) identique à la partie **5'** de l'ADN à amplifier.
- Une **amorce** (oligonucléotide 2) inversée et complémentaire à la partie **3'** de l'ADN à amplifier.
- Des **dNTP** en suffisance (désoxy Nucléotides Tri Phosphates: dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- Une **polymérase** d'ADN **thermorésistante** (par exemple la Taq ou la Pwo polymérase, découvertes dans les bactéries thermophiles *Thermus aquaticus* et *Pyrococcus woei*. La Taq est plus efficace, mais la Pwo commet moins d'erreurs).
- Un **tampon réactionnel** adéquat.

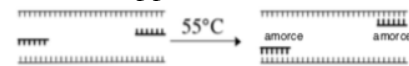
L'amplification de la séquence cible s'effectue au cours de cycles successifs, comprenant trois étapes chacun.

3.e.3. PCR: décomposition d'un cycle

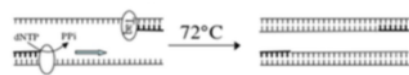
-Une étape de dénaturation de l'ADN matrice à haute température (en principe 94°C). Pendant cette étape, les ADN double brins se dissocient en ADN simple brins



-Une étape d'appariement de l'ADN avec les amorces (en principe à une température située entre 50 et 60°C). Lors de cette étape, les ADN double brins se reforment. La thermodynamique favorise l'appariement des amorces avec l'ADN cible.



-Une étape d'élongation de l'ADN (en principe à 72°C), pendant laquelle les amorces appariées à l'ADN cible sont allongées à partir de leur extrémité 3' par la polymérase. La polymérase utilise les désoxyribonucléotides présents en excès. La séquence des bases incorporées est complémentaire à la séquence de l'ADN simple brin servant de modèle



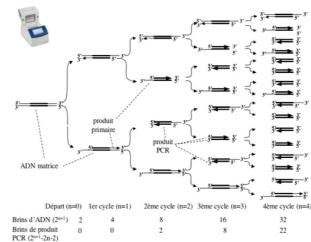
3.e.4. PCR: amplification

Les fragments de la taille attendue sont générés dès le deuxième cycle d'une amplification par PCR.

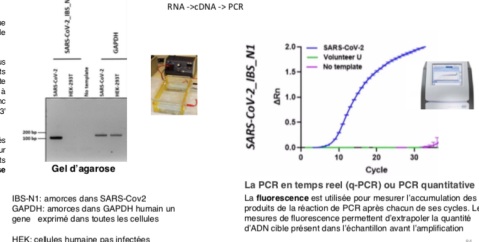
Au premier cycle, des produits plus longs sont générés (produits primaires), car une amorce ne délimite que la partie 5' de la séquence à amplifier, et la polymérase est donc libre de poursuivre l'élongation en 3' tant que les conditions le permettent.

Les produits primaires ne sont formés qu'à partir de l'ADN matrice et leur amplification est linéaire. Les produits de la taille attendue, eux, **se multiplient de façon exponentielle**.

PCR: amplification



PCR: détection des produit de PCR



3.e.5. PCR: détection des produit de PCR

IBS-N1 : amorces dans SARS-Cov2

GAPDH : amorces dans GAPDH humain un gene exprimé dans toutes les cellules

HEK : cellules humaine pas infectées

La PCR en temps réel (q-PCR) ou PCR quantitative

La fluorescence est utilisée pour mesurer l'accumulation des produits de la réaction de PCR après chacun de ses cycles. Les mesures de fluorescence permettent d'extrapoler la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon avant l'amplification

3.e.6. Clonage moléculaire

Propagation et amplification de DNA introduit dans une cellule hôte (en général E. coli). Le clonage nécessite un **véhicule (vecteur de clonage)** capable de se répliquer dans la cellule hôte et portant un gène de sélection.

Pour E. coli, les vecteurs sont dérivés de **plasmides** (< 20kb de DNA inséré) ou de phages (< 50kb), ou des BAC (bacterial artificial chromosome, < 300kb). Pour la levure, on utilise des plasmides et des YAC (yeast artificial chromosomes, < 1000kb).

Plasmide : petit chromosome supplémentaire, circulaire, non-essentiel, présent chez certaines bactéries (plasmide recombinant confère la résistance à des antibiotiques), ou levures.

Les vecteurs sont alors composés de :

- origine de la répllication (E. coli)
- gène de sélection (résistance à un antibiotique)
- un fragment de chromosome inséré

3.e.6.a. Principe du clonage moléculaire

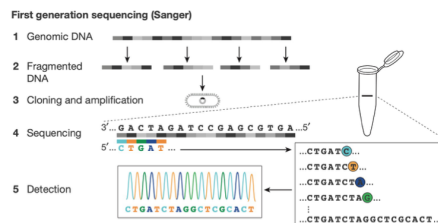
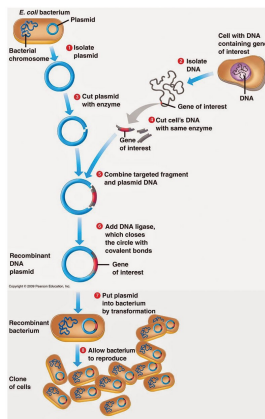
Le clonage moléculaire consiste, dans un premier temps, à **insérer un fragment d'ADN** d'intérêt (par exemple, un gène que l'on veut étudier, et que l'on a amplifié par PCR) **dans un plasmide**. Le vecteur et le DNA à cloner sont digérés par des **enzymes de restriction** et fusionnés par un autre enzyme, **la ligase**, résultant en un mélange de DNA recombinants.

On fait ensuite entrer ce plasmide dans une cellule hôte, en général une bactérie. Le plasmide contient une **résistance à un antibiotique** (sélection).

La bactérie va se diviser, le plasmide et l'ADN que l'on y a ajouté vont se transmettre de cellules-mères en cellules-filles: on obtient ainsi un **grand nombre de cellules qui contiennent toutes notre fragment d'ADN d'intérêt**.

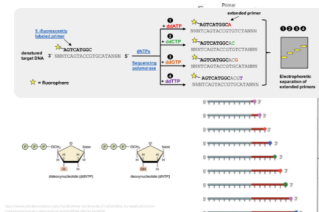
En recherche, cette technique permet d'utiliser des bactéries comme "**usines**" pour fabriquer en grande quantité des plasmides avec ADN ou des protéines ou une enzyme que l'on veut étudier.

Cette technique permet aussi de **fabriquer un grand nombre de médicaments (biologiques)**: certains vaccins, l'insuline, l'hormone de croissance etc...



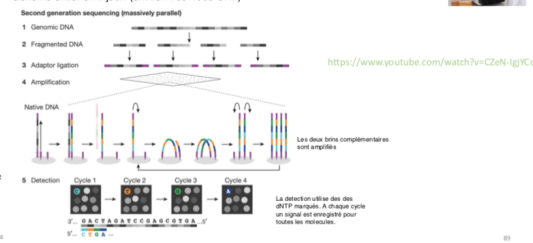
Séquençage de première génération (Sanger)

Principe : réplication in vitro en présence d'un analogue de un des nucléotides qui bloque l'élongation de la chaîne (ddNTP), 4 réactions sont nécessaires pour chaque nucléotide possible:



Séquençage de deuxième génération (NGS)

Next generation ou massive parallel sequencing dès 2005 utilise le multiplexing de masse. Génome entier en 1 jour. (environ 100-1000 CHF)



3.e.6.b. Séquençage de première génération (Sanger)

Principe :

réplication in vitro en présence d'un analogue de un des nucléotides qui bloque l'élongation de la chaîne (ddNTP), 4 réactions sont nécessaires pour chaque nucléotide possible:

3.e.6.c. Séquençage de deuxième génération (NGS)

Next génération ou massive parallel sequencing dès 2005 utilise le multiplexing de masse.

Génome entier en 1 jour. (environ 100-1000 CHF)

3.e.6.d. Comparaison Sanger et Illumina (NGS) Comparaison Sanger et Illumina (NGS)

Table 1: A comparison of Illumina NGS and CE-Based Sanger Sequencing

Technology	Starting Material	Samples per Run	Run Time*	Read Length	Number of Reads	Output per Run	Applications
CE-based Sanger Method	1-3 µg	1-96	0.5 hrs	550 bp [†]	1-96	0.550-62.5 kb	DNA sequencing, resequencing, microsatellite analysis, SNP genotyping
	50 ng Illumina [®] kit	1 lane	4 hrs	1 × 36 bp [†]	2.4 million (single reads)	1 Gb	DNA sequencing, gene regulation analysis, quantitative and qualitative sequencing-based transcriptome analysis, SNP discovery and structural variant analysis, cytogenetic analysis, ChIP-protein interaction analysis
Illumina MiSeq [®] System	0.1-1 µg TruSeq [®] kit	Flow cell	27 hrs	2 × 150 bp [†]	3 billion (single reads)	Up to 600 Gb	ChIP-Seq, sequencing-based methylation analysis, small RNA discovery and analysis, de novo, metagenomics, metatranscriptomics
Illumina HiSeq [®] System	50 ng Illumina [®] kit	Single or dual 8-lane flow cell	1.5-11 days	2 × 100 bp [†]	3 billion (single reads)	Up to 600 Gb	

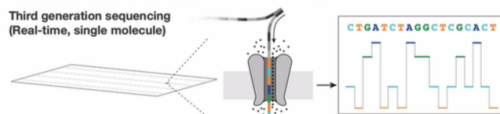
* CE-based run time does not include 4-hour sequencing reaction on the thermocycler prior to loading. NGS sequencing and base detection occurs concurrently during the run.
[†] Base pairs with quality scores of 30 (Q30).
 ‡ > 50% of base pairs have quality scores of 30 (Q30).
 § > 75% of base pairs have quality scores of 30 (Q30).
 ¶ > 80% of base pairs have quality scores of 30 (Q30).

3.e.6.e. Séquençage de troisième génération

Exemple: nanopore sequencing:

Le séquençage de l'ADN par les nanopores permet de déterminer l'ordre dans lequel les nucléotides sont disposés sur un fragment d'ADN donné à l'aide de nanopores (trou avec un diamètre de l'ordre du nanomètre). La quantité de courant qui peut passer dans le nanopore diffère selon si le nanopore est obstrué par un A, un T, un G ou un C ce qui permet de faire une lecture directe de la séquence d'ADN.

En cours de développement. Pas d'amplification, pas de détection par laser, rapide pour lire en 15 min pour génome humain. Équipement portable



3.f. Applications du génie génétique

Les techniques du DNA recombinant (génie génétique) sont utiles pour la recherche biologique et médicale. Elles ont aussi des applications pour l'environnement, la biotechnologie, et la médecine.

Exemples:

- Produire des Protéines à usage thérapeutique grâce à des outils du génie génétique
- Thérapie génique somatique chez l'homme
- Vaccins à ARN ou à ADN
- En recherche pour la transgénèse animale
- En agronomie, en sciences de l'environnement ...

3.f.1. 555 entrées autorisées à usage humain

555 entrées autorisées à usage humain avec un principe actif produit par génie génétique (2021)

Deux souris sont nécessaires:

- Une qui a le site à enlever modifié avec les sites LoxP
- Une qui exprime la Cre sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique

Ces souris sont croisées pour mettre ensemble les deux parties du système (Cre/Lox)

3.f.3.b. Animaux transgéniques RH vs CRISPR/Cas9

3.g. Introduction à la génomique

3.g.1. Vecteurs en thérapie génique

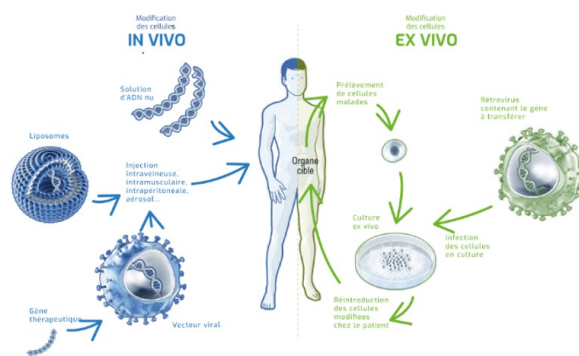
Thérapie génique:

Introduction d'acides nucléiques dans une cellule ou un individu pour corriger une pathologie, ou exprimer un antigène

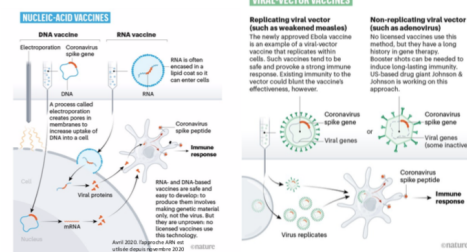
Administration

- ex vivo- cellules isolées, modifiées génétiquement et re-transplantées
- in vivo- transfert direct de matériel génétique chez le patient

LES DEUX VOIES DE LA THÉRAPIE GÉNÉTIQUE



Stratégies vaccinales



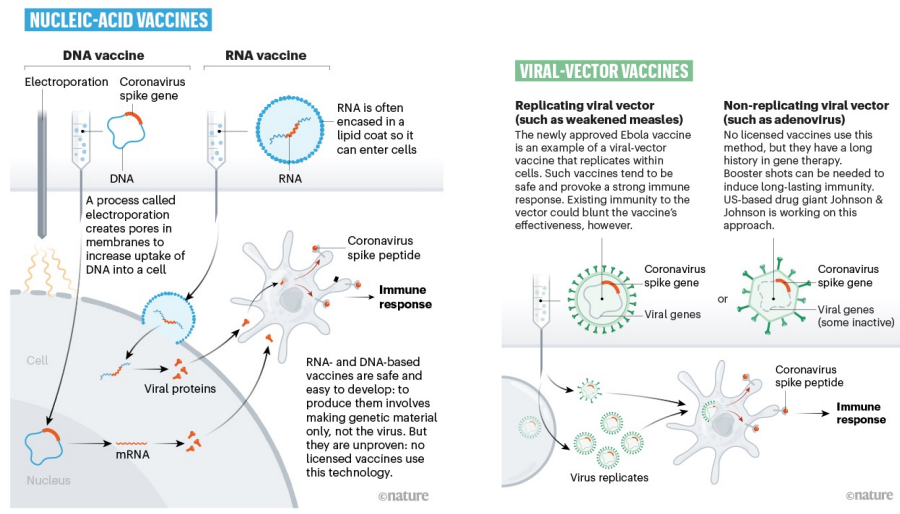
3.g. CAR T cells en cancerologie

Les CAR font partie d'une série d'avancées prometteuses dans la lutte contre le cancer grâce au développement de **thérapies adoptives de transfert de cellules modifiées**.

Des lymphocytes du patient sont prélevés puis génétiquement modifiés pour leur les **doter d'un récepteur CAR spécifique d'un antigène exprimé par les cellules tumorales du patient**.

Les cellules immunitaires, réintroduites dans le patient, peuvent alors reconnaître et tuer les cellules cancéreuses.

3.g. Stratégies vaccinales



4. Génomique et analyse génotypique

Les études globales de la structure des génomes, puis la détermination de la séquence de plusieurs d'entre eux, ont révélé **l'organisation des génomes**, tout en permettant d'analyser comment ceux-ci ont **évolué**. Ces études unifient la génétique classique et la génétique moléculaire car on peut maintenant connaître l'organisation globale des gènes et des séquences non codantes d'une espèce donnée et les replacer dans le génome entier.

Les séquences génomiques, couplées aux techniques d'amplification rapide et d'analyse à grande échelle de **polymorphisme** et d'**expression** des milliers de gènes en parallèle, ainsi que les progrès de la bio-informatique, conduisent à une accumulation très rapide de nouvelles connaissances et à l'établissement de **cartes génétiques** de plus en plus précises.

4.a. Carte génétique

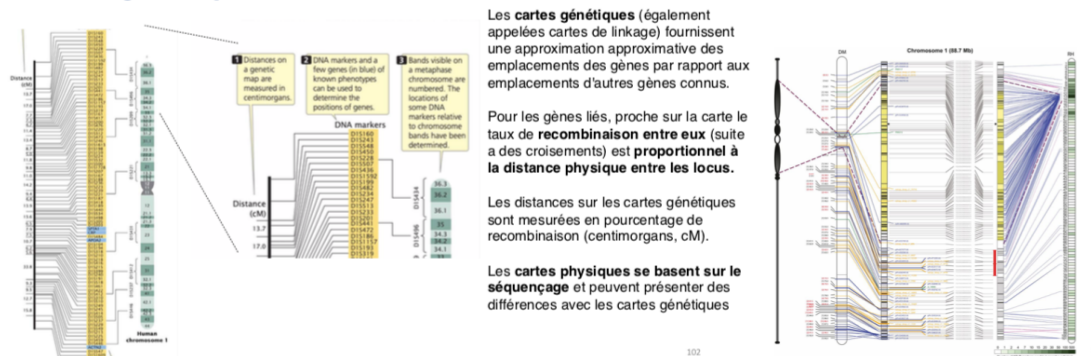
Les **cartes génétiques** (également appelées cartes de linkage) fournissent une approximation approximative des emplacements des gènes par rapport aux emplacements d'autres gènes connus.

Pour les gènes liés, proche sur la carte le taux de **recombinaison entre eux** (suite à des croisements) est **proportionnel à la distance physique entre les locus**.

Les distances sur les cartes génétiques sont mesurées en pourcentage de recombinaison (centimorgans, cM).

Les **cartes physiques** se basent sur le **séquençage** et peuvent présenter des différences avec les cartes génétiques

Carte génétique



4.b. Génotypage

• Le génotypage est l'ensemble des analyses génétiques moléculaires visant à déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique dans le génome, pour un individu ou un groupe d'individus donné appartenant à une espèce

Il est effectué :

- Soit par séquençage de l'ADN
- Soit par d'autres techniques tel que le génotypage microsatellite dans des laboratoires, RFLP, PCR, Southern blot etc..

4.b.1. Pénétrance d'un gène

La pénétrance, en génétique, est la portion d'individus possédant un génotype donné qui exprime le phénotype correspondant

Pourcentage des sujets porteurs du même gène dominant et exprimant la maladie. Il s'agit d'une évaluation **quantitative** (en %) du nombre d'individus

(ex. la pénétrance de BRCA1 est de 80% chez les femmes; La plupart des mutations sans NLRP3 dans les maladies auto-inflammatoires a une pénétrance de 100%. cf cours B1.2)

Peut varier selon le sexe, l'ethnicité, l'âge: dans la maladie de Huntington, la pénétrance est de 100 % à 75 ans mais n'est que de 50 % à 50 ans.

4.b.2. Expressivité

L'expressivité, en génétique, est le degré de la manifestation phénotypique de l'anomalie génétique ou chromosomique.

Degré d'intensité des manifestations morbides en rapport avec un trait autosomique dominant (le phénotype peut être plus ou moins sévère selon les individus; ils ont tous la pathologie mais expressivité variable du gène; il s'agit d'une évaluation **qualitative**):

Exemples: L'expressivité, dans les anomalies par répétition de paires de base, dépend du nombre de répétitions comme dans la chorée de Huntington.

4.b.3. Le risque génétique

Les maladies **monogéniques**: causées par des variants dans un seul gène. Ces maladies sont rares. Une maladie est considérée comme rare si elle ne touche pas plus de cinq personnes sur 10

000. Jusqu'à présent, entre 6 000 et 8 000 maladies rares ont été décrites dans le monde. (défi diagnostique défi traitement)

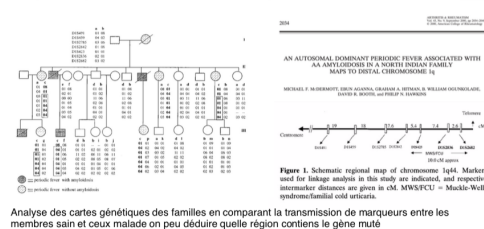
On parle de maladies **polygéniques** lorsqu'elles sont influencées par de multiples variants génétiques qui peuvent avoir des effets minimes ou importants. C'est le cas de maladies communes telles que le diabète, l'obésité, l'hypertension, les maladies coronariennes ou encore l'asthme. Des facteurs comme l'alimentation, le tabagisme ou l'exposition environnementale contribuent également à déterminer la survenue de la maladie. (facteurs de susceptibilité environnementaux et génétiques)

Identification d'un locus causant une maladie

Analyse des cartes génétiques des familles en comparant la transmission de marqueurs entre les membres sain et ceux malade on peu déduire quelle région contiens le gène muté

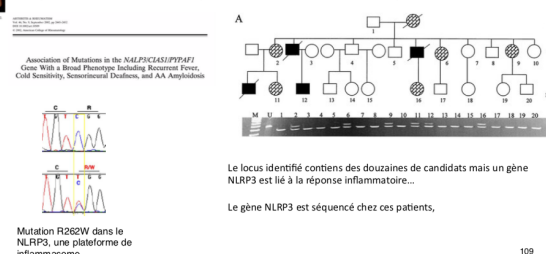
Identification d'un locus causant une maladie

Exemple CAPS (maladie autoinflammatoire cf cours B1.2)



Identification d'une mutation causant une maladie

Exemple de NLRP3 muté dans CAPS (maladie autoinflammatoire cf cours B1.2)



Identification d'une mutation causant une maladie

Le locus identifié contiens des douzaines de candidats mais un gène NLRP3 est lié à la réponse inflammatoire...

Le gène NLRP3 est séquencé chez ces patients,

Exome sequencing

L'exome séquençage, aussi connu comme *whole exome sequencing* (WES), est une technique de séquençage génomique de toutes les régions codante pour des protéines de gènes dans un génome (connu sous le nom exome).

Il se compose de deux étapes:

- La première étape consiste à **sélectionner uniquement le sous-ensemble d'ADN qui code les protéines: les exons** - les humains ont environ 180 000 exons, constituant environ 1-2% du génome humain.
- La deuxième étape consiste à **séquencer l'ADN exonique** en utilisant n'importe quelle technologie de séquençage d'ADN à haut débit.

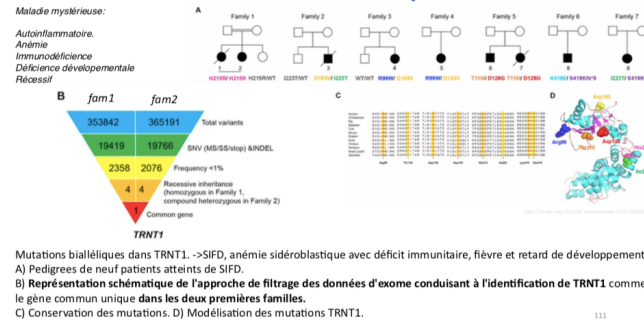
Le but de cette approche est d'identifier des variantes génétiques qui altèrent les séquences protéiques, et ce à un coût bien moindre que le séquençage du génome entier. En séquençant tous les membres de la famille on arrive parfois à identifier des mutations dominantes à partir de une ou deux familles seulement.

De l'exome à la mutation: un exemple

Mutations bialléliques dans TRNT1. ->SIFD, anémie sidéroblastique avec déficit immunitaire, fièvre et retard de développement

- A) Pedigrees de neuf patients atteints de SIFD.
- B) **Représentation schématique de l'approche de filtrage des données d'exome conduisant à l'identification de TRNT1** comme le gène commun unique dans les deux premières familles.
- C) Conservation des mutations.
- D) Modélisation des mutations TRNT1.

De l'exome à la mutation: un exemple



Empreinte génétique

- L'expression empreinte génétique provient de l'expression « **génétic fingerprint** » par analogie avec les empreintes digitales (propres à chaque individu) utilisées dans le cadre de l'identification des criminels.
- Une empreinte génétique = profil génétique est le résultat d'une analyse génétique, rendant possible l'identification d'une personne à partir d'une petite quantité de ses tissus biologiques (bulbe de cheveux, sang, salive, sperme). **Elle repose sur le fait** que bien que 2 humains aient une large majorité de leur patrimoine génétique identique, un **certain ensemble de séquences dans leur ADN reste spécifique à chaque individu** (en raison du polymorphisme). L'analyse de cette empreinte permet de comparer des séquences spécifiques d'un individu.

Polymorphisme, variant, mutant

Polymorphisme:

Une variation de la séquence d'ADN qui se produit dans une population avec une fréquence de 1% des allèles ou plus.

Un polymorphisme se produit naturellement, souvent avec un effet neutre ou bénéfique. Peuvent également être un ou plusieurs changements nucléotidiques, tout comme les mutations. Le SNP (polymorphisme d'une base) illustre le polymorphisme le plus courant, supposé se produire toutes les 1000 paires de bases dans le génome humain, et se trouve généralement dans les zones flanquant les gènes codant pour les protéines.

Les **SNP sont utilisés comme signatures génétiques** (empreinte) dans les populations pour étudier la prédisposition à certains traits, y compris les maladies. Chacun a une collection de SNP en principe unique. Si on trouve des SNPs qui s'associent presque toujours à une maladie, cela peu indique qu'un gène qui est hérité avec le SNP peut contribuer à la maladie.

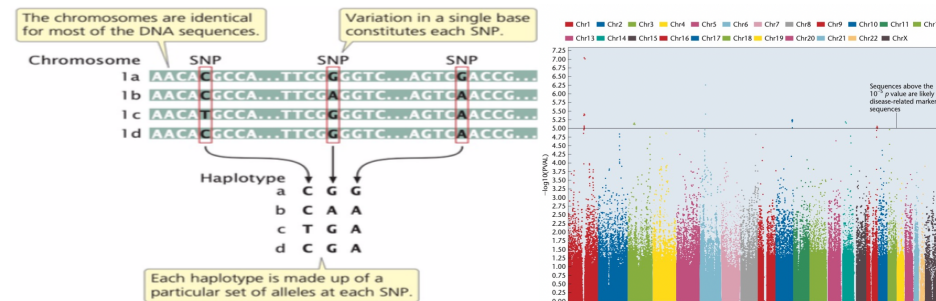
- **Mutation:**

En comparaison, toute modification rare de la séquence nucléotidique, généralement mais pas toujours associée à un attribut causant une maladie, est appelée «mutation»

- **Variant :**

Le terme de polymorphisme que dans le cas d'étude de populations (génétique des population). Dans les autres cas si le terme «mutation» ne peut pas être utilisé il est remplacé par le terme neutre «variant»

SNP



Étude d'association pangénomique

Cette approche consiste à **catégoriser les patients selon leur signes cliniques**, et de les corréler avec des SNP

Une étude GWA pour le diabète de type 2 a révélé 386 371 marqueurs génétiques, regroupés ici par numéro de chromosome. **Les marqueurs au-dessus de la ligne noire semblaient être associés de manière significative à la maladie.**

GWA identifie des gène de susceptibilité

Les études sur l'association genome-wide (GWA) ont des revues sur la nature

La génétique identifié 18 intervalles génomiques qui confèrent un risque accru de diabète de type 2 chez les Caucasiens

Chevauchement des loci des facteurs de risque génétiques pour les maladies courantes. Une découverte surprenante des études d'association genome-wide (GWA) est que des loci sont associés au risque de développer deux maladies ou plus.

Génétique inverse : du gène à la fonction

- Génétique classique: identifier la protéine défectueuse et sa fonction puis identifier le gène
- Génétique inverse : **identifier le gène** impliqué puis “remonter” à la **protéine** et définir la fonction

- Analyse de la séquence, comparaison avec des gènes similaires (motifs conservés, homologues dans d'autres espèces, etc...)
- Localisation dans la cellule, tissu, organisme - Interactions avec d'autres produits de gènes
- Expression (tissus, stimuli)
- Analyse fonctionnelle à l'aide de modèles cellulaires ou animaux (orthologues)- Mutants, surexpression, knock-outs, CRISPR/Cas9..

Génétique fonctionnelle: séquençage d'ARN (RNA-Seq)

Séquençage de l'ARNm exprimé dans un tissu (qualitatif et quantitative)

Exemple DLBCL, Lymphome diffus à grandes cellules B

Un examen pathologique ne permet pas de distinguer les différent sous-type de DLBCL, Une analyse d'expression des ARNm permet de classer les tumeur en 3 types GCB, ABC ou UC.

Chaque type va répondre à un traitement différent.

C'est un outil diagnostique.

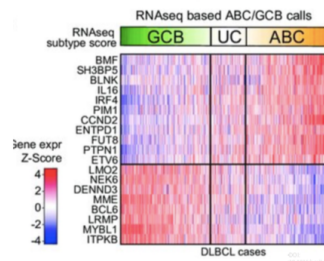
Génétique fonctionnelle: séquençage d'ARN (RNA-Seq)

Séquençage de l'ARNm exprimé dans un tissu (qualitatif et quantitative)

Exemple DLBCL, Lymphome diffus à grandes cellules B

Un examen pathologique ne permet pas de distinguer les différent sous-type de DLBCL, Une analyse d'expression des ARNm permet de classer les tumeur en 3 types GCB, ABC ou UC. Chaque type va répondre à un traitement différent.

C'est un outil diagnostique.



Conclusion

- Pharmacogénomique: traitement plus personnalisé
- Traits complexes: maladies multifactorielles
- Profil génétique des personnes pour déterminer quel gène est défectueux (predisposition) et le traitement approprié (locus susceptible)
- Médecine prédictive et préventive
- Problème éthique: utilisation du profil génétique de l'individu

Lien video pour le cours

[Developpment -Génétique - Génétique moléculaire -1](#)

[Developpment -Génétique - Génétique moléculaire -2](#)

[Developpment -Génétique - Génétique moléculaire -3](#)