

Génétique Humaine

Révisions



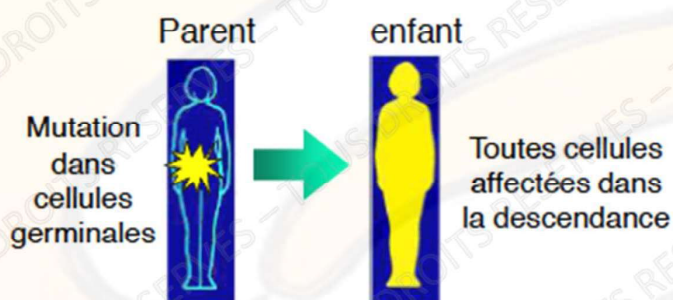
F. Gesbert

franck.gesbert@universite-paris-saclay.fr



Variations du génome - Mutations

Germine/Constitutionnelle



- présent dans les cellules germinales
- héréditaire
- Analyse possible à partir de tout tissu (Sang, Salive...)
- Législation précise pour effectuer ce type d'analyse
- Nécessité d'un consentement éclairé

Somatique



- Survient dans les tissus non germinaux
- Non héréditaire
- Nécessite d'avoir accès au tissu atteint pour l'analyse
- Pas de législation spécifique en dehors de la législation relative à de la Biologie Médicale



Modifié par [LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 2](#)

L'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou son identification par empreintes génétiques sont régis par les dispositions du chapitre III du titre Ier du livre Ier du code civil et par les dispositions du présent titre, sans préjudice des dispositions du titre II du présent livre.

Toutefois, lorsqu'il est impossible de recueillir le consentement de cette personne ou, le cas échéant, de consulter la personne de confiance mentionnée à [l'article L. 1111-6](#), la famille ou, à défaut, un de ses proches, l'examen ou l'identification peuvent être entrepris à des fins médicales, dans l'intérêt de la personne.

Modifications du génome et méthodes d'analyses

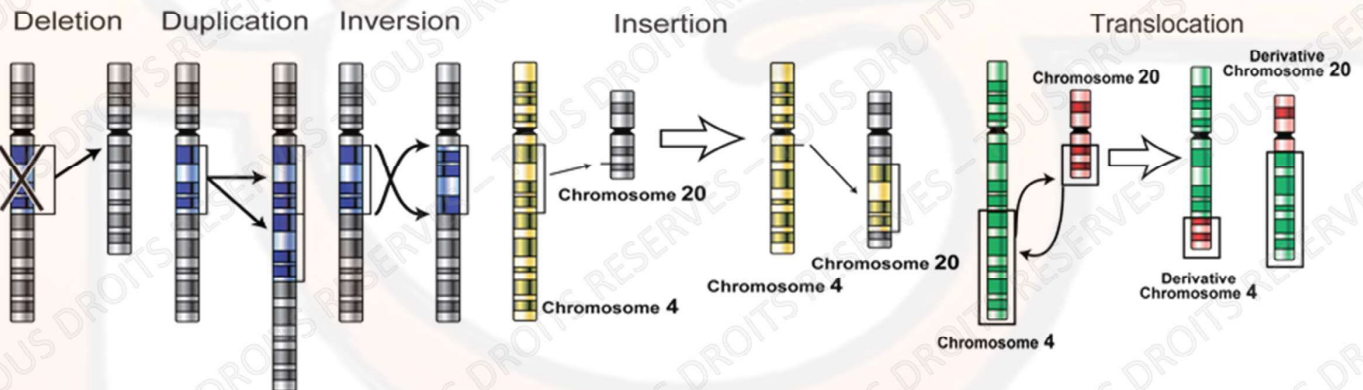




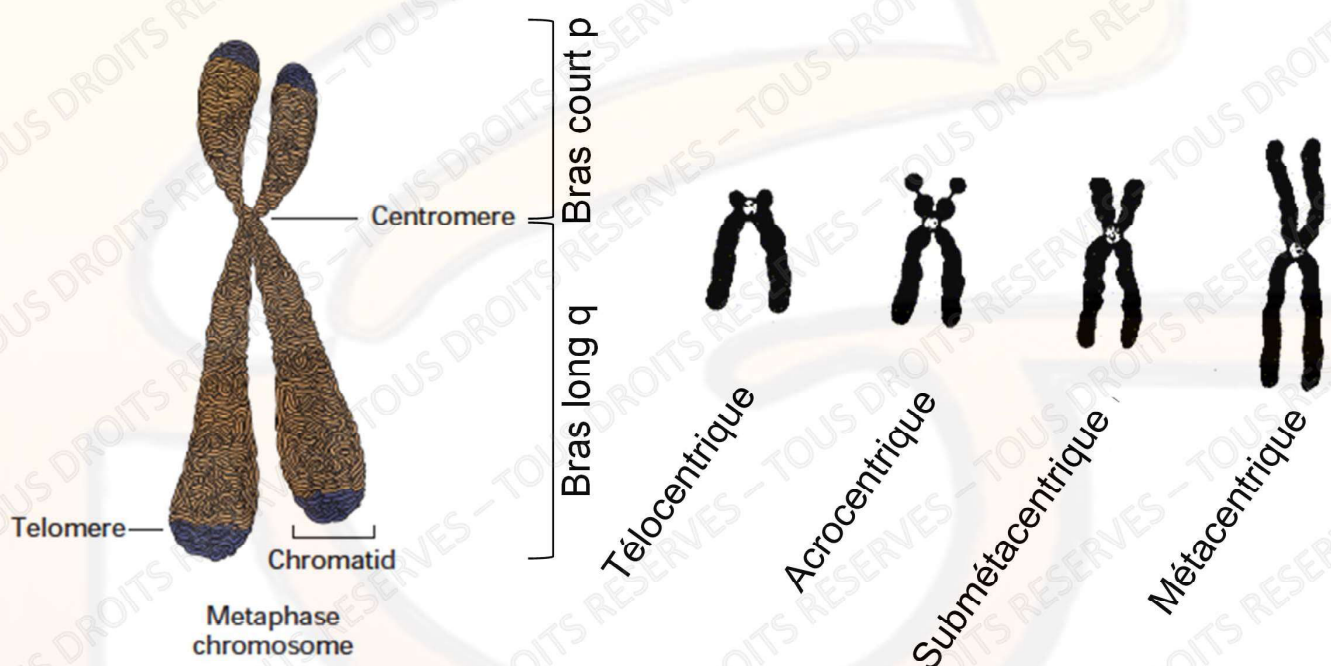
Variations du génome - Mutations

Les Macrolésions

- Délétion
- Duplication
- Amplification
- Inversion
- Fusion ou translocation
- Insertion



Chromosomes - structure, nomenclature





Caryotype

I- A partir de cellules nucléées en division
(culture au moins 72h pour obtenir des plaques métaphasiques)

- Lymphocytes circulants
- Cellules amniotiques
- Cellules trophoblastiques
- fibroblastes...

II- Extraction

- Blocage à la Colchicine
- choc hypotonique

III- Coloration

R Banding: RHG (Rbanding, Heat, Giemsa)

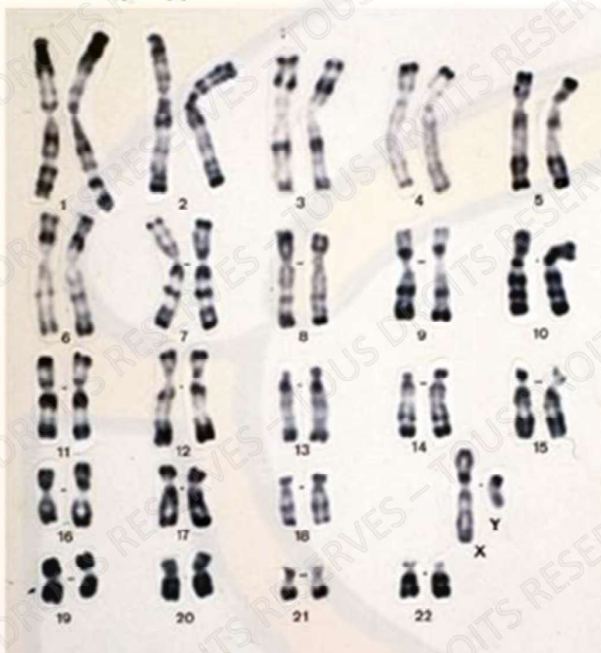
G Banding: GTG (Giemsa, Trypsine, Giemsa)

IV- Observation et analyse



Caryotype

Caryotype normal en bandes R



- Le caryotype a une résolution de 10Mbases au mieux, nécessite des cellules en division,

- Identifications d'anomalie de nombre :

- Aneuploïdie : triploïdies, tétraploïdies
- Aneusomies : monosomies, trisomies

- de structure :

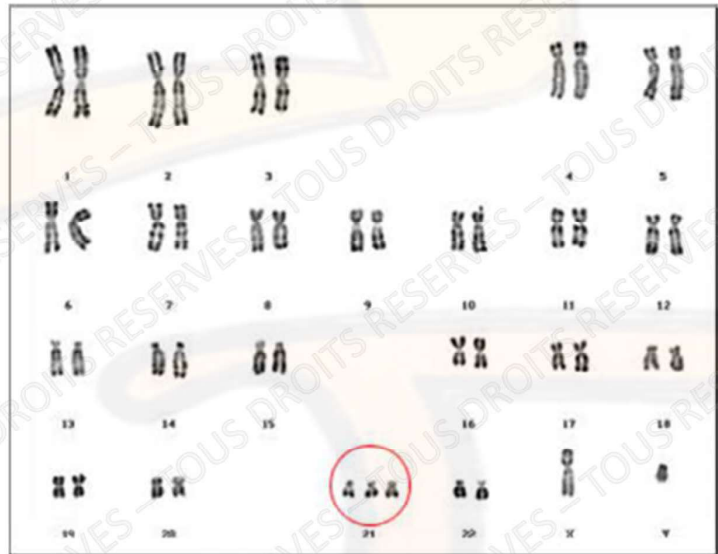
- Translocations et insertions, Inversions Délétions, duplications et gains, amplifications

- Essor aussi avec l'utilisation de la fluorescence

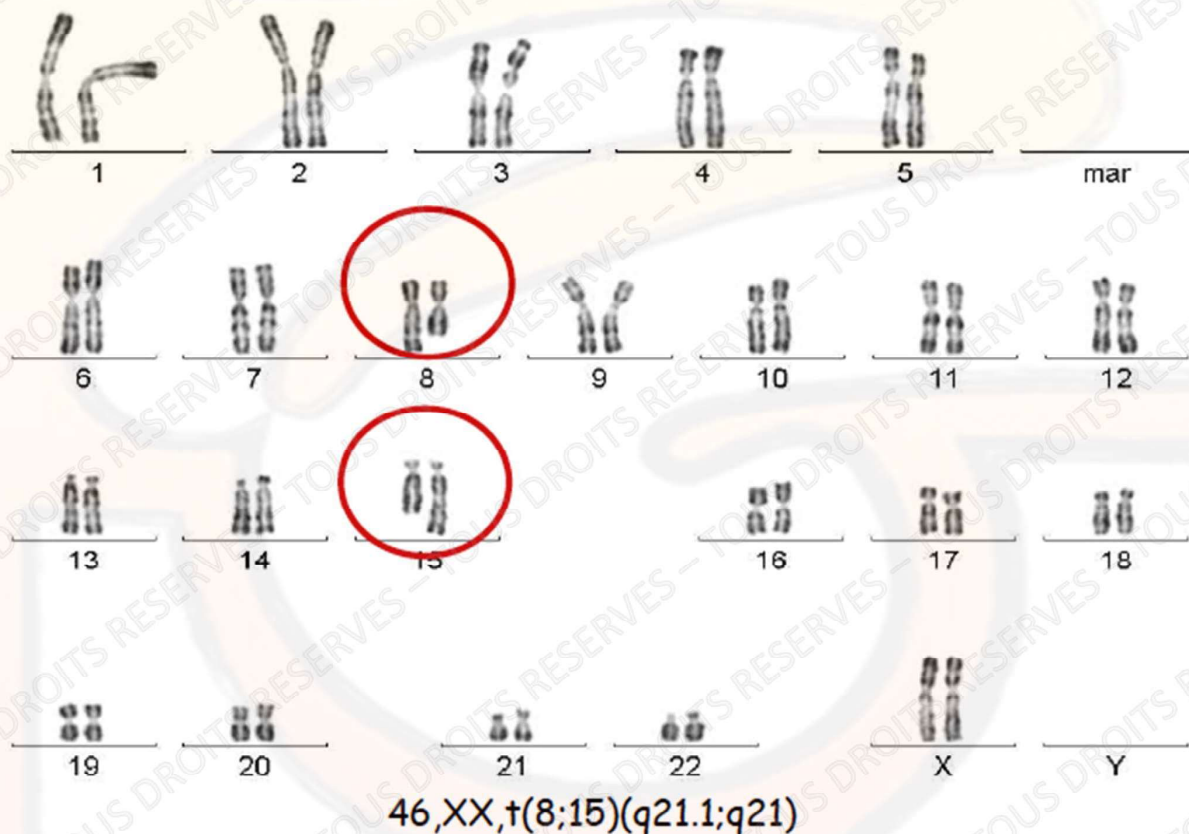


Erreurs de ségrégation chromosomique

- Première aberration chromosomique
- Première cause de retard mental ($1/800 \rightarrow 1/2000$)
- Clinique : Dymorphie, hypotonie axiale, malformations cardiaques et digestives, retard mental, risque de tumeurs (leucémie)
- Diagnostic post natal
- Diagnostic prénatal (diag. Certitude)
 - caryotype réalisé à partir de :
 - amniocentèse (14-17 SA)
 - trophocentèse (11-14 SA)



Anomalies de structure





Caryotype d'une cellule cancéreuse

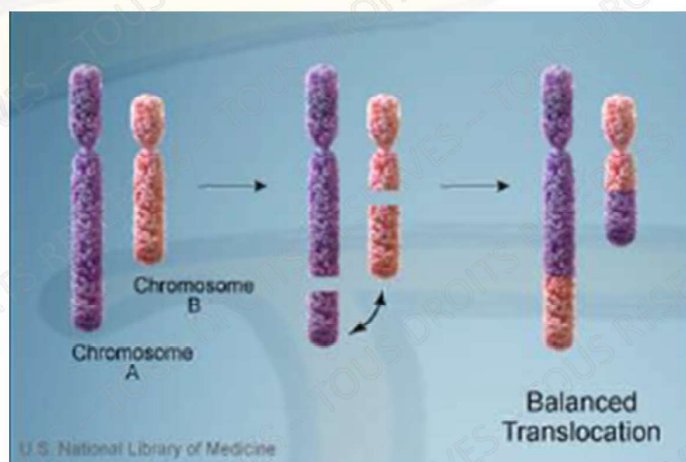
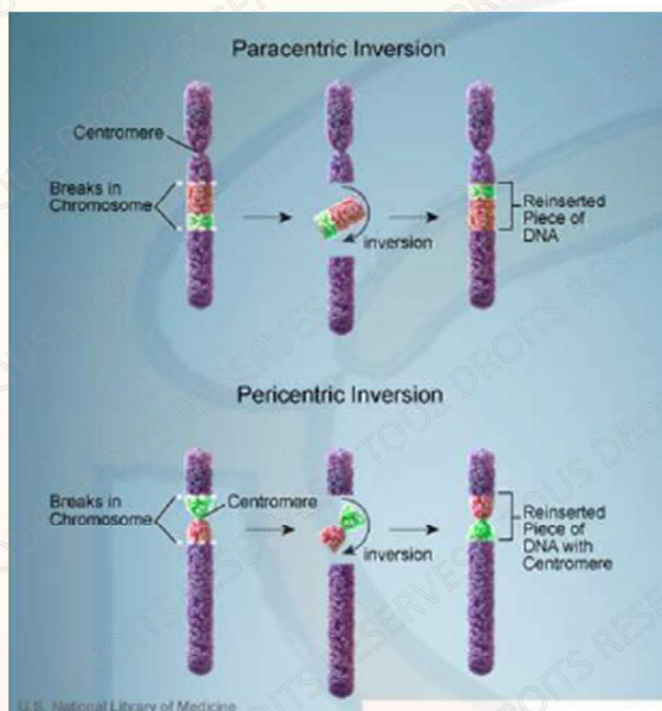


Université Paris-Saclay | Faculté de Pharmacie | Université Paris-Saclay | Faculté de Pharmacie

10



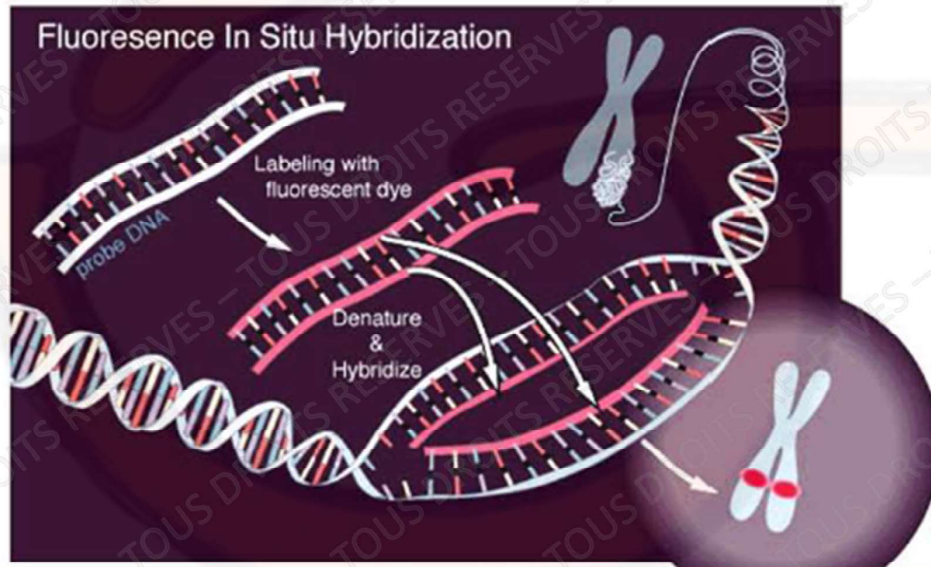
Anomalies de structure



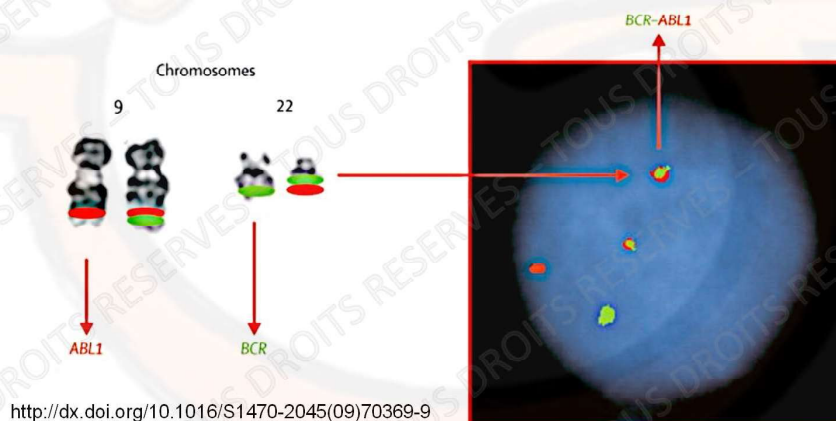
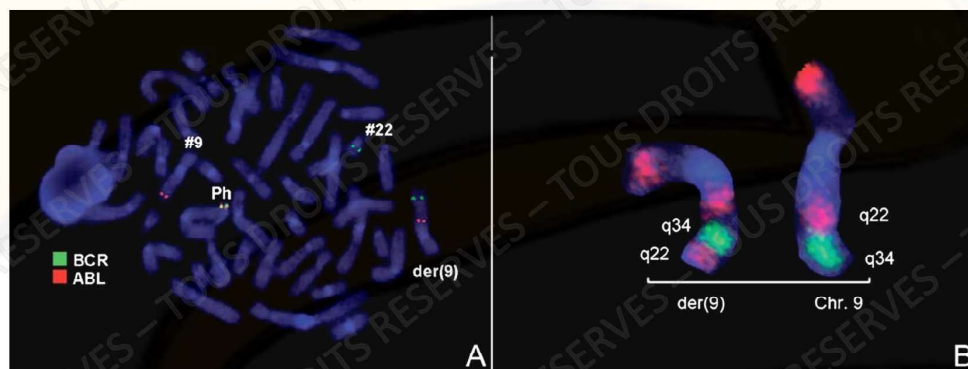
Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

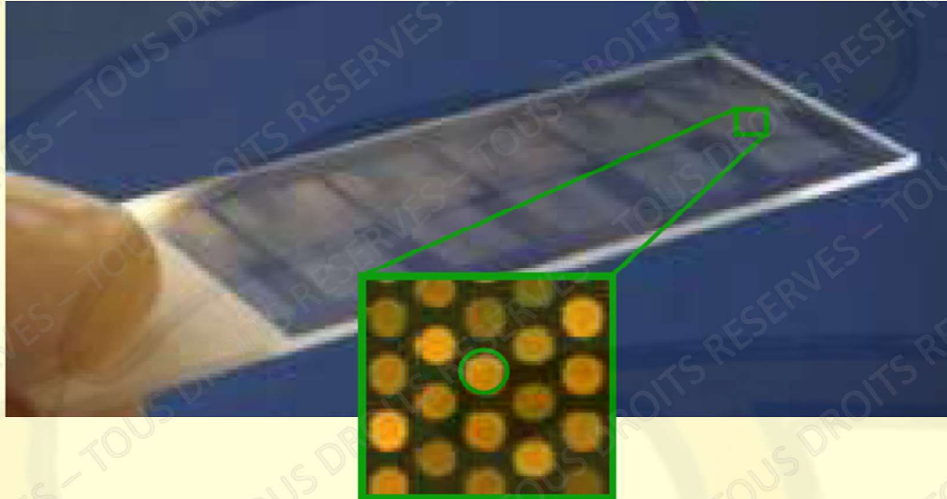
• Principe

- Sonde = ADN marqué spécifique d'une région que l'on veut étudier
- Cible = chromosomes ou noyaux ou cellules que l'on veut tester



FISH — détection de translocation

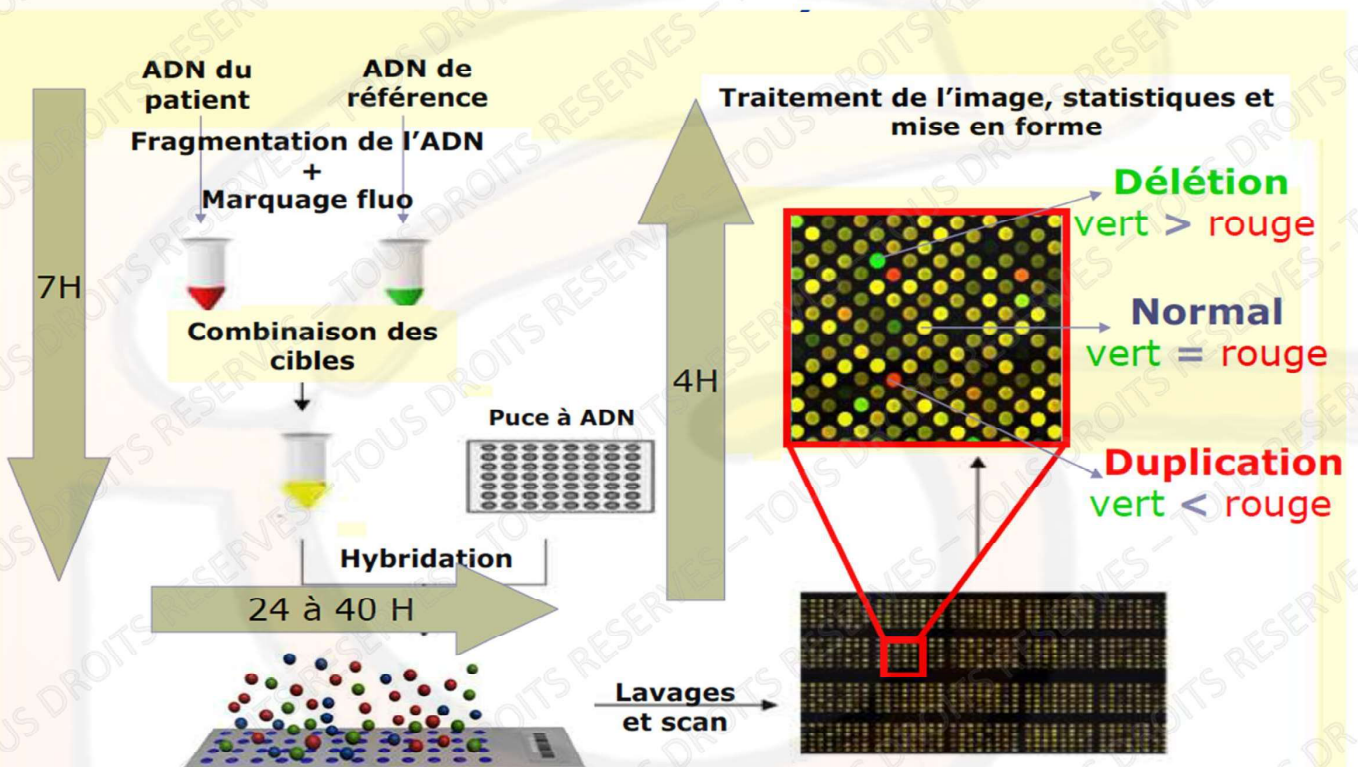


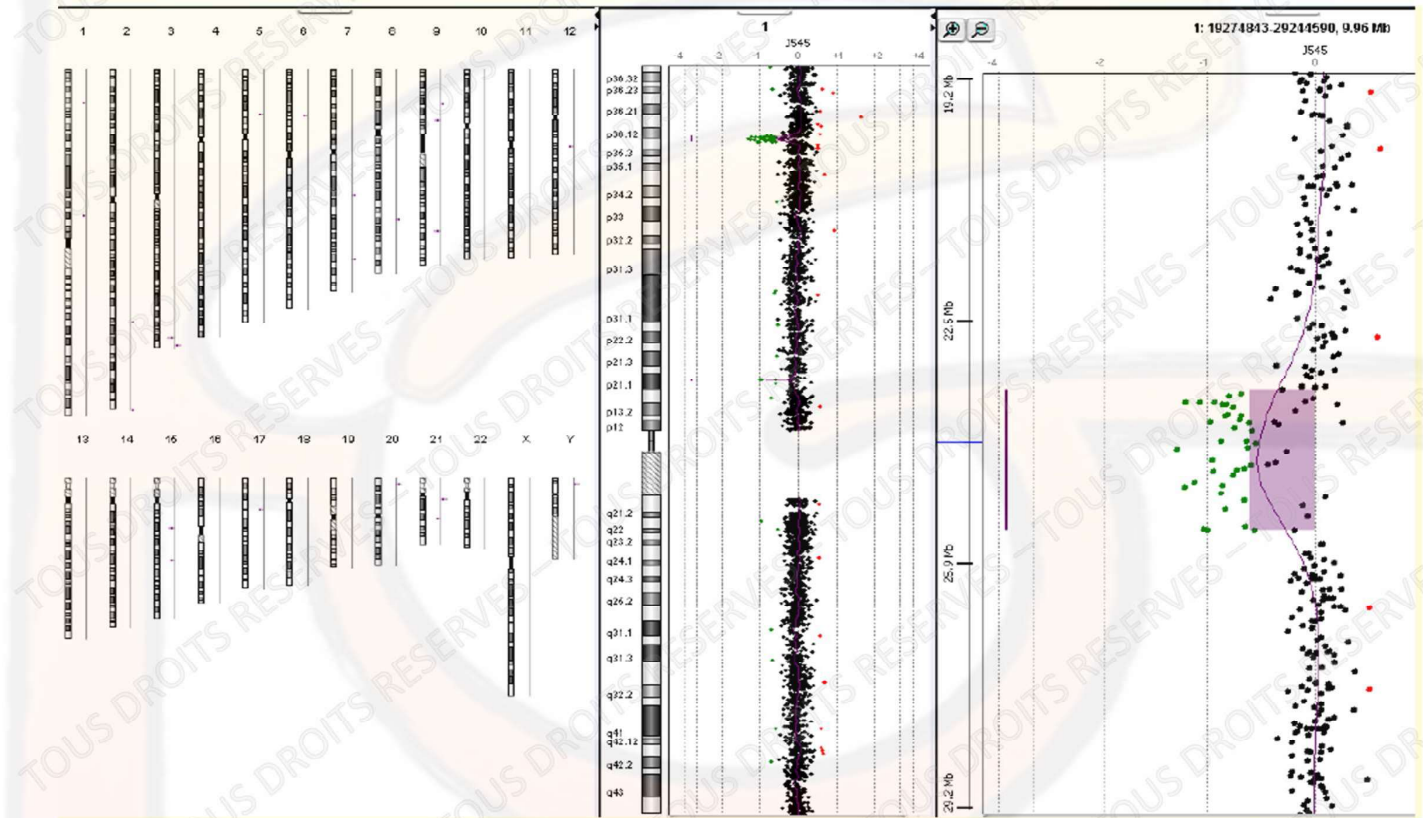


1 spot = 1 séquence d'ADN présente en multiples copies.

1 bonne sonde = **séquence d'ADN unique présente dans le génome humain.**

Plus il y a de sondes différentes sur la puce à ADN, meilleure sera la résolution de la puce (+ d'informations).





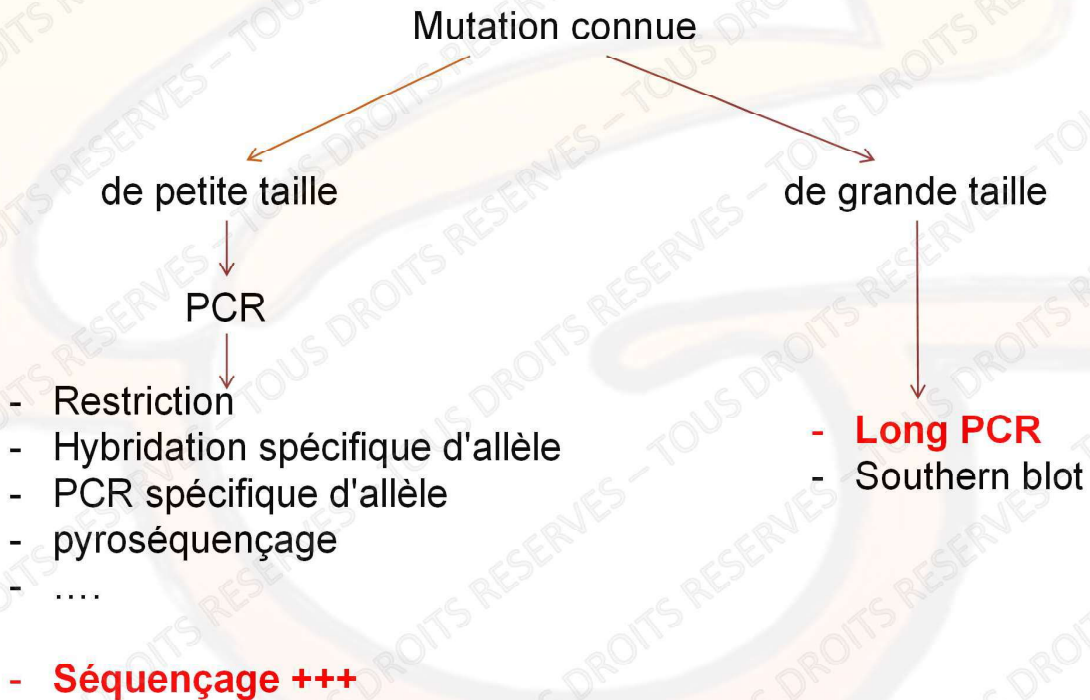
Les mutations ponctuelles

Les Microlésions

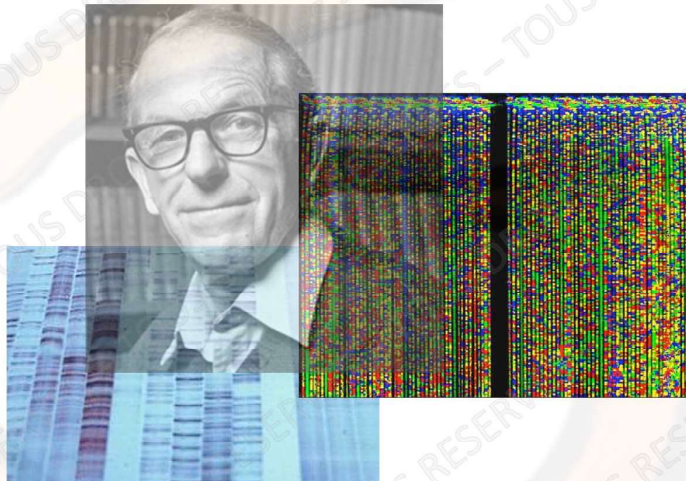
- substitutions
 - suppressions
 - additions
- d'un ou quelques nucléotides

La transformation d'une base en une autre base est une mutation ponctuelle

Mutation type	<i>silent</i>	<i>missense</i>	<i>nonsense</i>	<i>readthrough</i>
New amino acid	Gly	His	Stop	Leu
Change in DNA	GGA	CAU	UAA	UUA
Triplet code of original DNA sequence	ATG GGC ATT CGT AGC TAT CCA TAAAAA TAT ATA...			
	Met Gly Ile Arg Ser Tyr Pro Stop			



La méthode de Terminaison d'élongation



Frederick Sanger (1918-2013)



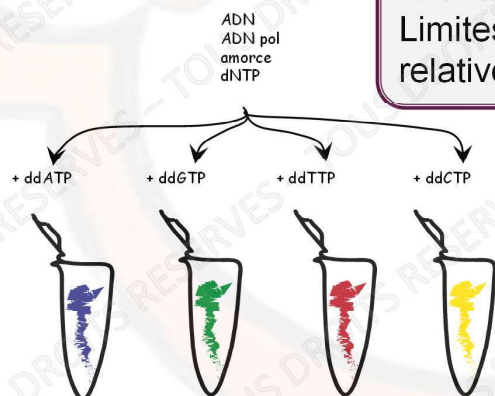
Chimie, 1980 (et...accessoirement chimie, 1958)

séquençage par terminaison d'élongation

Principe:

L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire à la matrice que nous souhaitons séquencer en utilisant des dNTP. Synthèse initiée au site d'hybridation de l'amorce fournie. En veillant à ce que les dNTP soient en excès par rapport au ddNTP ajouté dans chacun des mélanges réactionnel. Aléatoirement, la polymérase ajoutera un ddNTP interrompant ainsi l'élongation. Si des ddNTP différents ont été ajoutés dans chacun des mélanges, et ce de manière exclusive, alors nous pourrions déterminer la séquence.

Avantages : Très précis, facile à mettre en oeuvre
Limites : faible longueur relative des séquences lues, relativement couteux, lent



Cette technique est toujours utilisée pour les petits projets et est à la base des projets de séquençage haut débit automatisés.

Dans les séquenceurs automatiques à haut débit le dCTP³² n'est plus utilisé.

Chaque didéoxy-NTP porte un fluochrome de couleur différente.

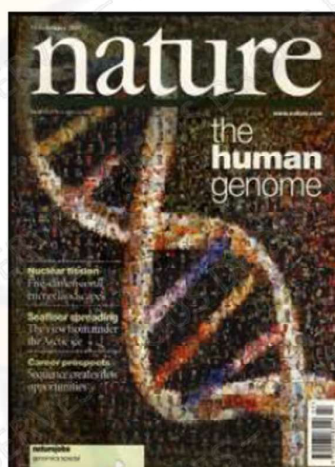
La réaction de synthèse est migrée en capillaire et "lue" par un scanner.



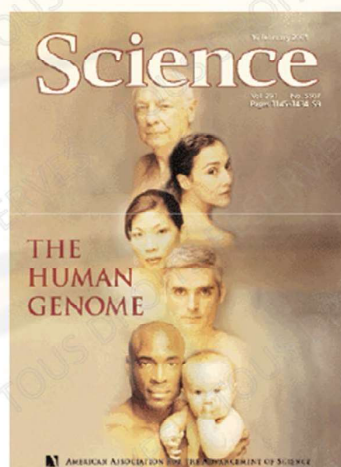
Chaque canal est lu comme un chromatogramme qu'il faut savoir lire et interpréter



Séquençage du génome humain en 2001



International Human Genome Sequencing Consortium



Celera



Evolution vers les "NGS", méthodes de séquençage à très haut débit où il n'y a plus de découplage entre synthèse et lecture (Plusieurs techniques, Solexa, Roche 454, Ion Torrent, SOLiD).

Applications:

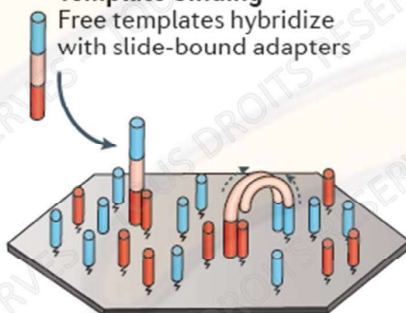
- Whole Genome Sequencing
- Exome sequencing
- RNA-Seq
- CHIP-Seq
- SNP/Indel

Séquençage – ILLUMINA/SOLEXA

b Solid-phase bridge amplification (Illumina)

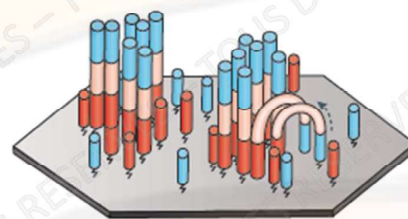
Template binding

Free templates hybridize with slide-bound adapters



Bridge amplification

Distal ends of hybridized templates interact with nearby primers where amplification can take place

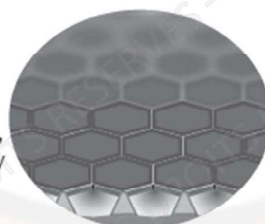


Cluster generation

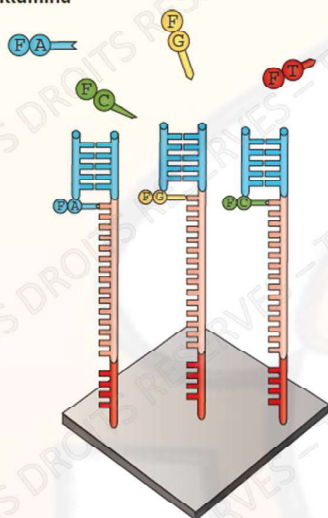
After several rounds of amplification, 100–200 million clonal clusters are formed

Patterned flow cell

Microwells on flow cell direct cluster generation, increasing cluster density

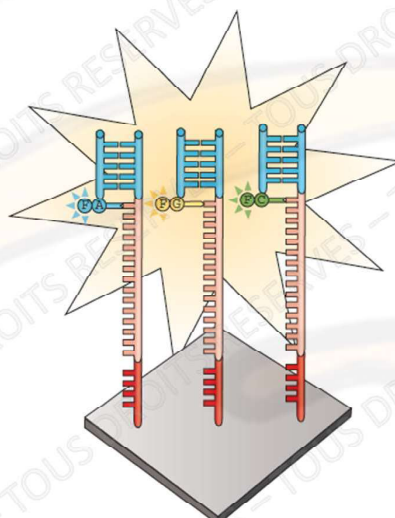


a Illumina



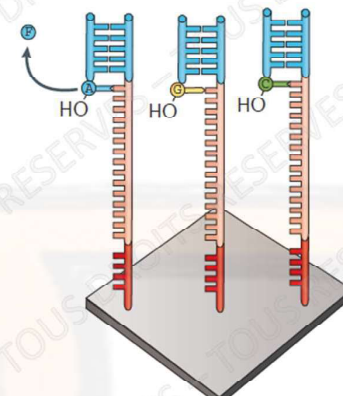
Nucleotide addition

Fluorophore-labelled, terminally blocked nucleotides hybridize to complementary base. Each cluster on a slide can incorporate a different base.



Imaging

Slides are imaged with either two or four laser channels. Each cluster emits a colour corresponding to the base incorporated during this cycle.

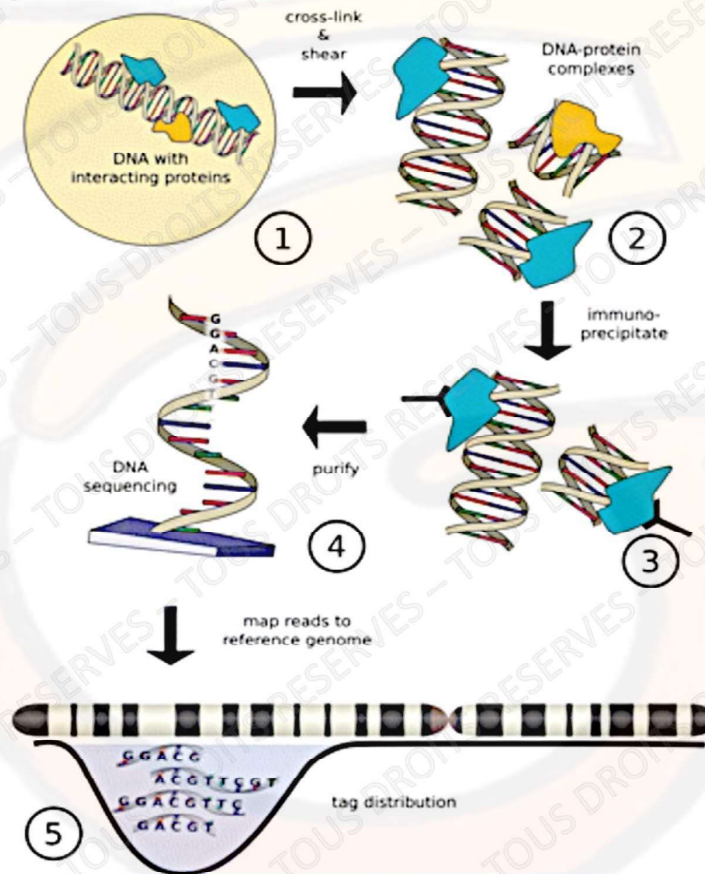


Cleavage

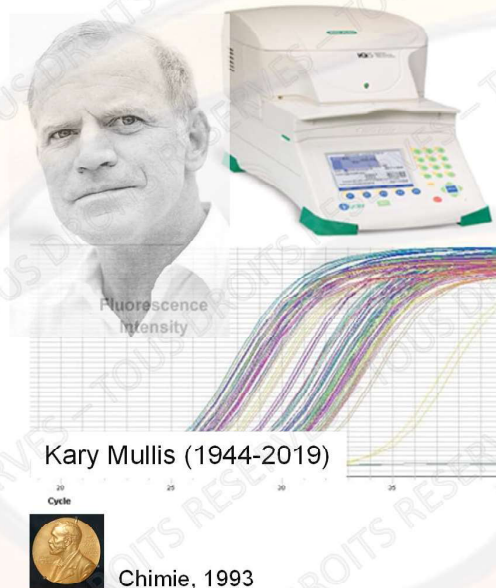
Fluorophores are cleaved and washed from flow cells and the 3'-OH group is regenerated. A new cycle begins with the addition of new nucleotides.

Sanger vs NGS

Method	Single-molecule real time sequencing	Ion semiconductor	Pyrosequencing (454)	Sequencing by synthesis (Illumina)	Sequencing by ligation (SOLID sequencing)	Chain termination (Sanger sequencing)
Read length	2900 bp average ¹	200 bp	700 bp	50 to 250 bp	50+35 or 50+50 bp	400 to 900 bp
Accuracy	87% (read length mode), 99% (accuracy mode)	98%	99.9%	98%	99.9%	99.9%
Reads per run	35–75 thousand	up to 5 million	1 million	up to 3 billion	1.2 to 1.4 billion	N/A
Time per run	30 minutes to 2 hours	2 hours	24 hours	1 to 10 days, depending upon sequencer and specified read length	1 to 2 weeks	20 minutes to 3 hours
Cost per 1 million bases	\$2	\$1	\$10	\$0.05 to \$0.15	\$0.13	\$2400
Advantages	Longest read length. Fast. Detects 4mC, 5mC, 6mA.	Less expensive equipment. Fast.	Long read size. Fast.	Potential for high sequence yield, depending upon sequencer model	Low cost per base.	Long individual reads. Useful for many applications.
Disadvantages	Low yield at high accuracy. Equipment can be very expensive.	Homopolymer errors.	Runs are expensive. Homopolymer errors.	Equipment can be very expensive.	Slower than other methods.	More expensive and impractical for larger sequencing projects.



La PCR (Polymerase Chain Reaction)

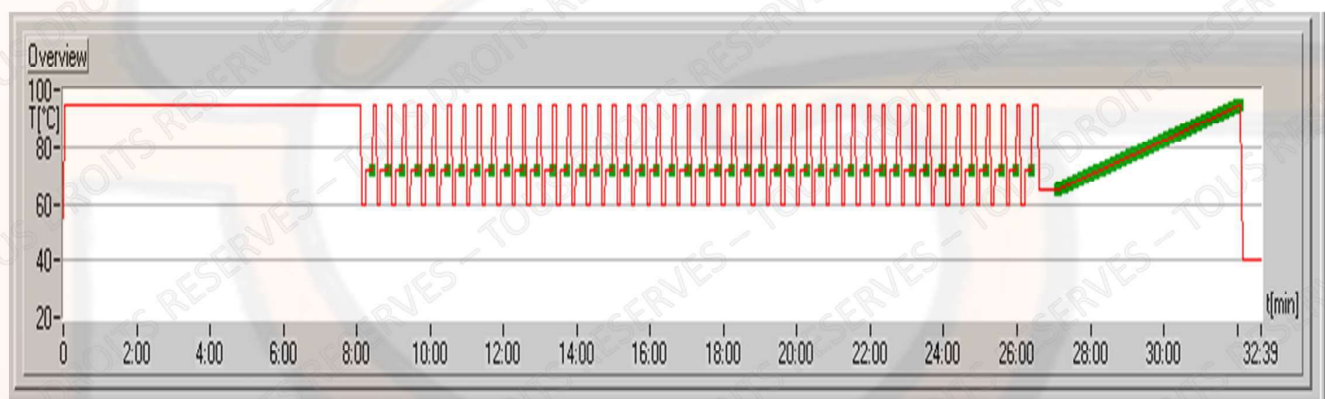


**Dénaturation
Activation
(8 min)**

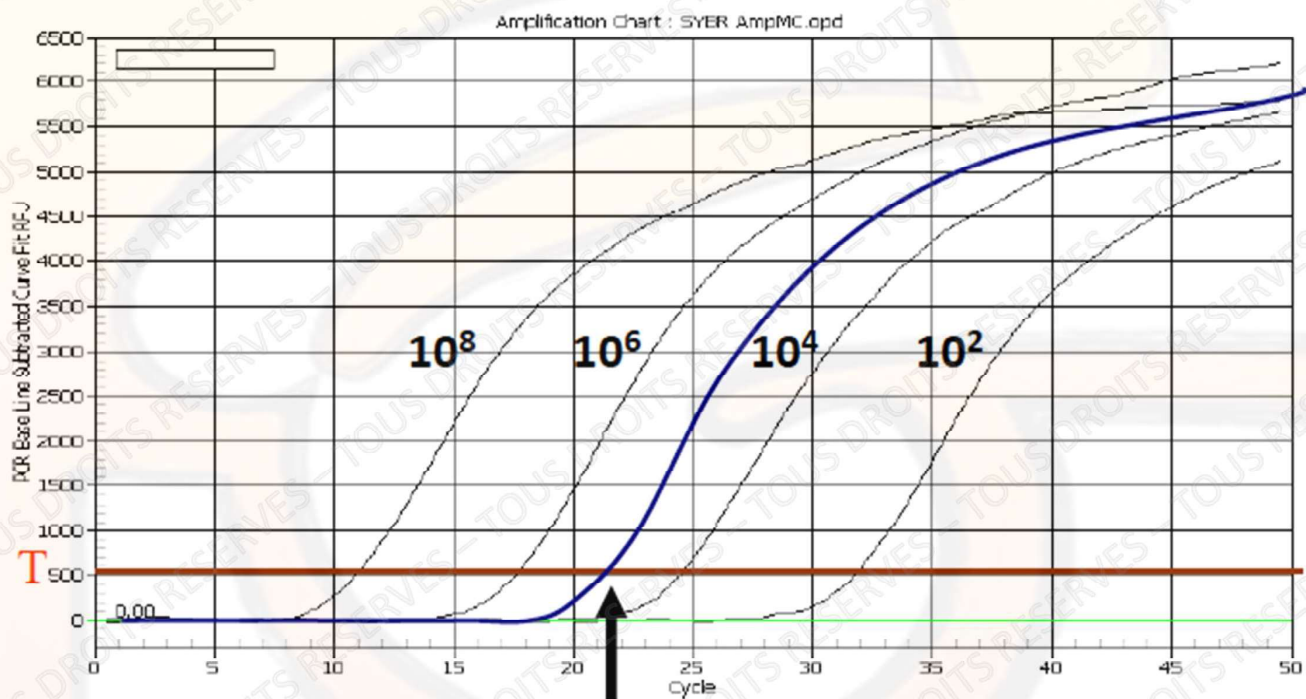
1. Dye in solution emits low fluorescence

2. Emission of the fluorescence by binding

Fusion (5 min)



Durée totale ~ 30-40 min

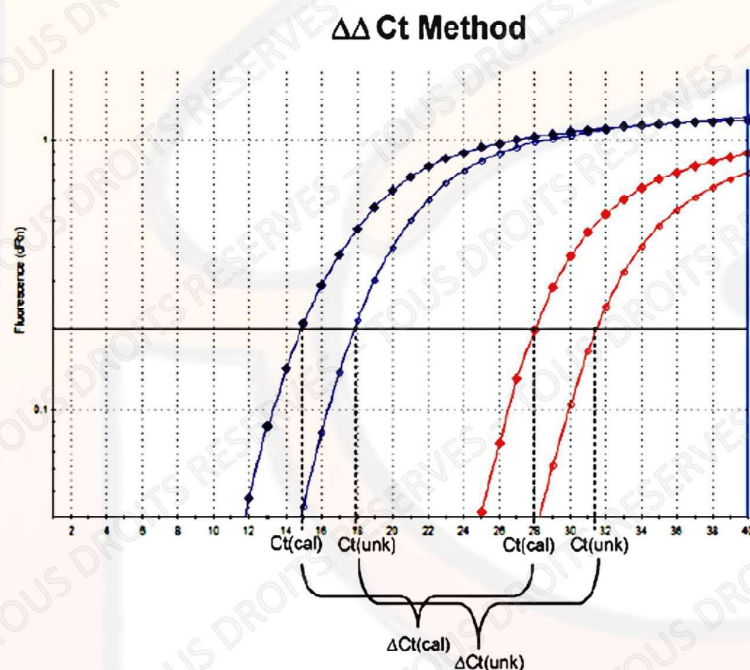


Quantification relative:

R = Fold difference (quantité relative au calibrateur)

Méthode du $\Delta\Delta C_t$

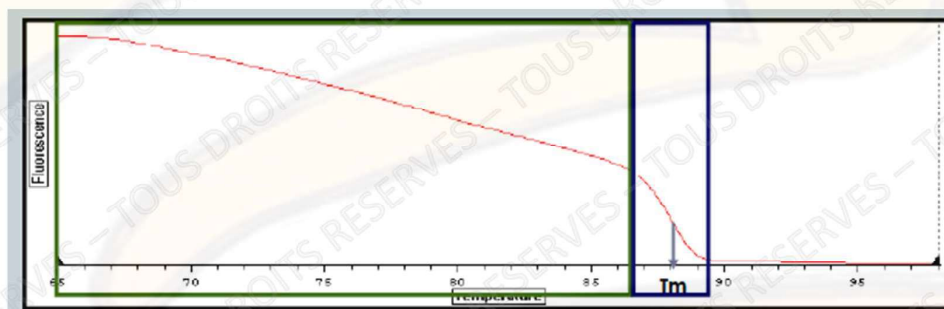
$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$



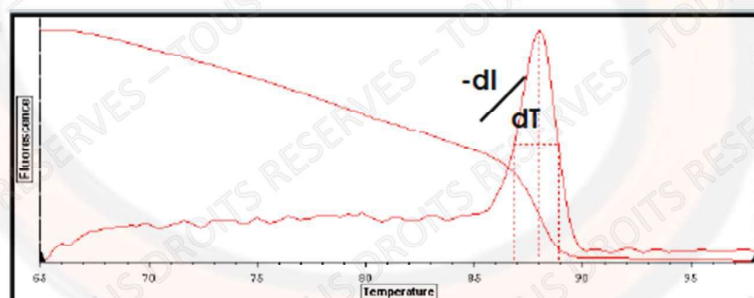
qPCR – Sybr green et courbe de fusion

T_m est le point d'inflexion de la courbe.

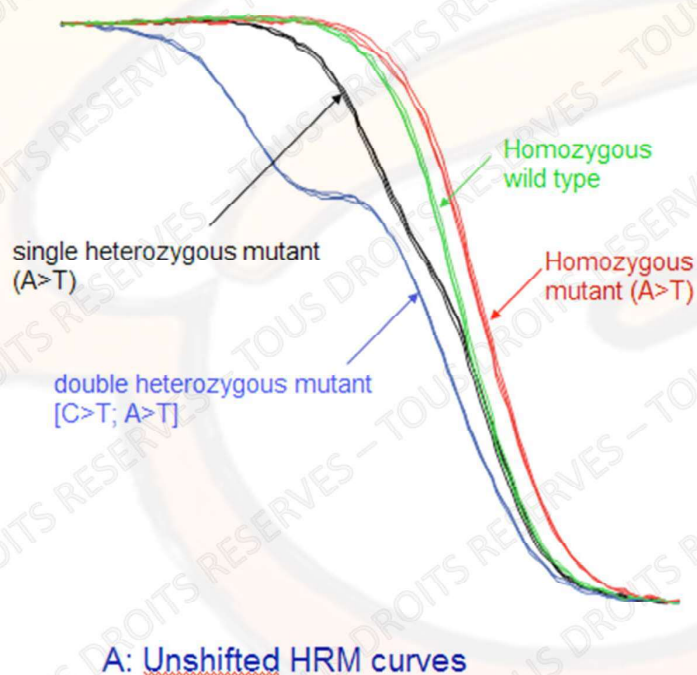
Correspond à 50% d'ADNdb et 50% d'ADNsb



On peut représenter $-dI/dT$



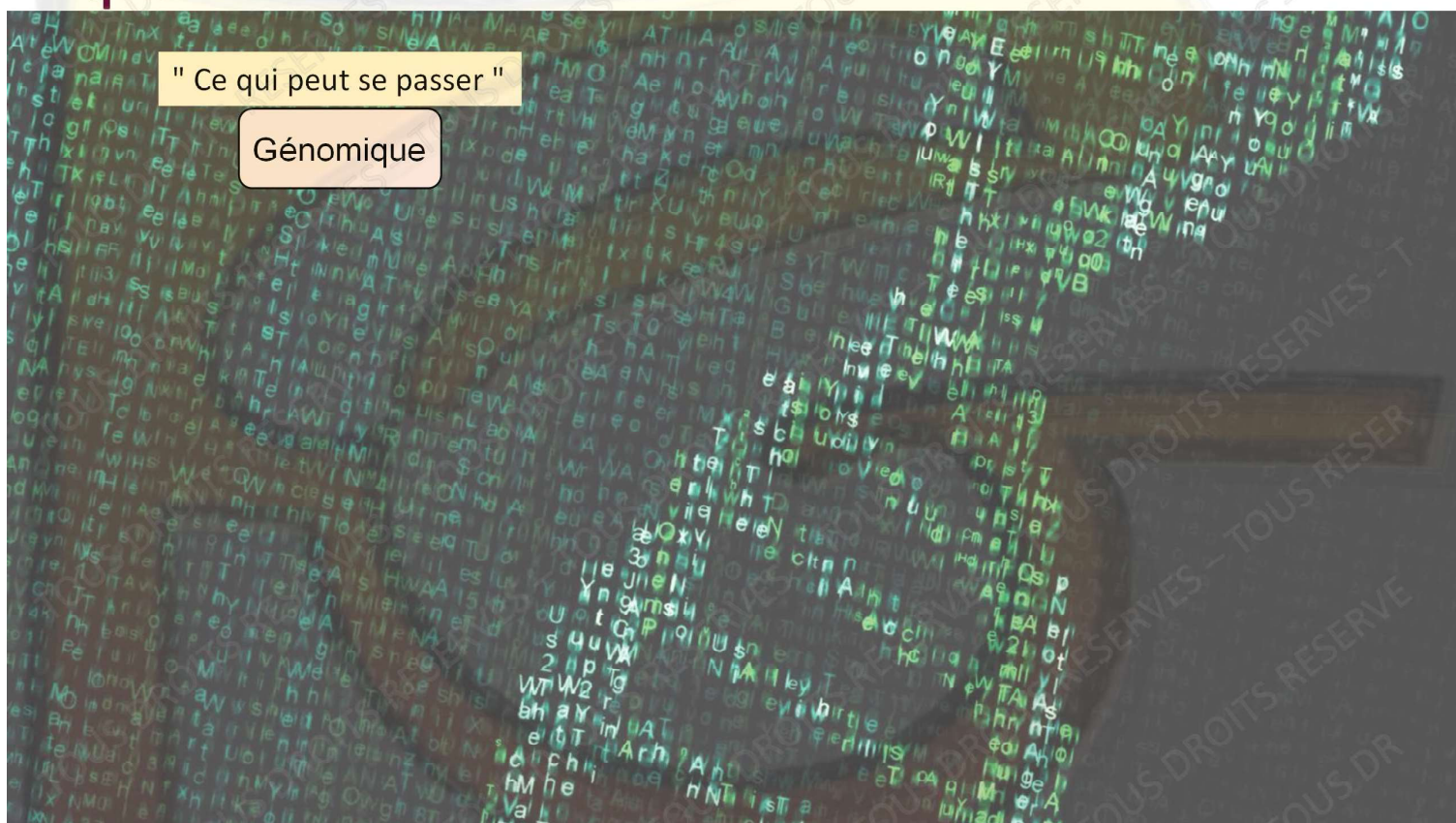
Information loss due to Temperature Shifting normalization



La cascade des "omiques" – la redécouverte du métabolisme

" Ce qui peut se passer "

Génomique



Ces variations dans la séquence d'ADN n'ont pas de conséquence pathologiques.

Les polymorphismes sont le résultat de "mutations".

Mutation : changement permanent et transmissible dans le matériel génétique

Ceci implique que "mutation" n'est pas synonyme de "pathologie"

Variations du génome - Polymorphismes

Un génome normal :

- 1 séquence de référence
- de nombreuses variations dans la population

=> les polymorphismes :

Séquences intra- ou inter-géniques considérées comme non pathologiques pour le sujet.

peuvent correspondre à des traits phénotypiques simples (couleur des yeux, etc.), et peuvent être associés à des risques spécifiques.

variabilité entre deux sujets compte pour environ 0,1% du génome humain, soit $3 \times 10^9 \text{ bp} \times 0,1\% \Rightarrow 3 \times 10^6 \text{ bp} !!!$





Variations du génome - Polymorphismes

Séquences répétées :

Réparties sur l'ensemble du génome mais en nombre très variable

Diverses origines (pseudo gènes , intégration d'élément dans l'évolution...)

- Microsatellites - STR (Short Tandem Repeat)

- Séquences courtes répétées en tandem
- 5 à 20 bp, les plus fréquentes sont XXX[CA]_nXXX
- tous les 40kb - longueur variable - Fonction inconnue
- Extension du nombre dans certaines maladies
e.g : syndrome de l'X fragile (OMIN 309550)

- Minisatellites – VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)

- Séquences répétées de 10 à plus de 100bp
- fonction dans la régulation de gène
e.g ADN télomériques (5'-TTAGGG-3') sur 5 à 15kb
e.g séquence « Alu »

-Macrosatellites

- répétitions de 100aine de Kb



Variations du génome - Polymorphismes

comprend les **STR**, les **VNTR** et des variations d'un seul nucléotide : **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism)

les SNP sont bi-alléliques

- Fréquence > 1% dans la population
- Transmission héréditaire stable
- permet d'établir des haplotypes
- environ 1 tous les 1,2 à 1,9kb

les STR – VNTR sont multi-alléliques

Utilisation pour:

- les cartographies
- les études de liaisons
- médecine légale.



LES SNP

Single Nucleotide Polymorphisms

Allèle A

...AGCATAGCAGCAATCAGCGCAGCAGTCTCTCTTCGCAAGCA...
...TCGTATCGTCGTTAGTCGCGTCGTCAGAGAGAAGCGTTCGT...



Allèle B

...AGCATAGCAGCAATCAGCAACAGCAGTCTCTCTTCGCAAGCA...
...TCGTATCGTCGTTAGTCGTGTCGTCAGAGAGAAGCGTTCGT...



LES SNP

Si un SNP modifie un site de restriction, il génère un RFLP.

Déterminer les allèles présents à un locus = **GÉNOTYPER**

Combien de génotypes possibles pour :

- RFLP 3 (AA , AB , BB)
- microsatellite à n allèles $n \times (n+1) / 2$
- SNP 3 (AA , AB , BB)

RFLP

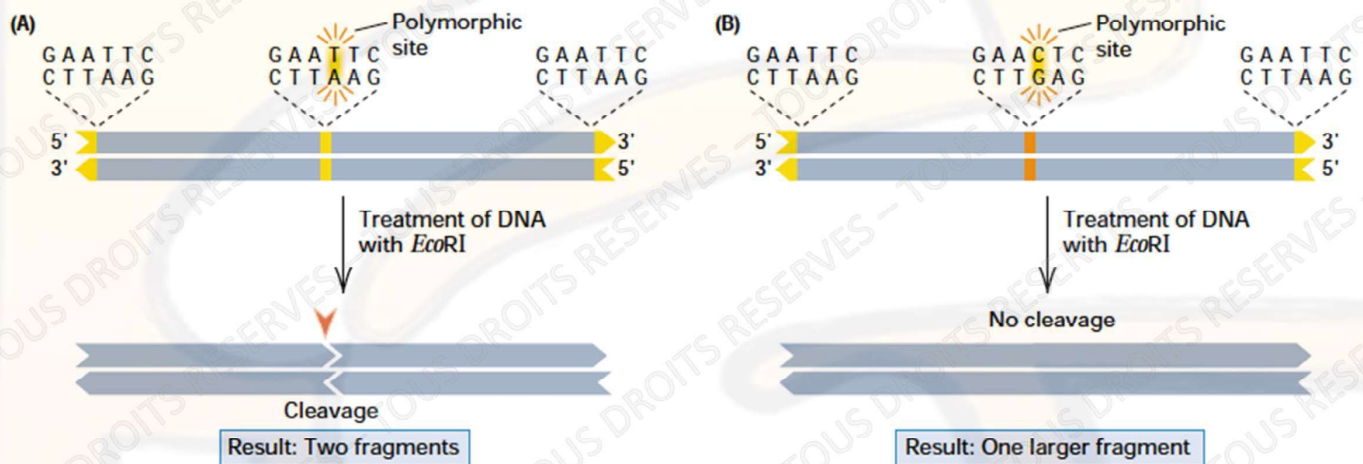
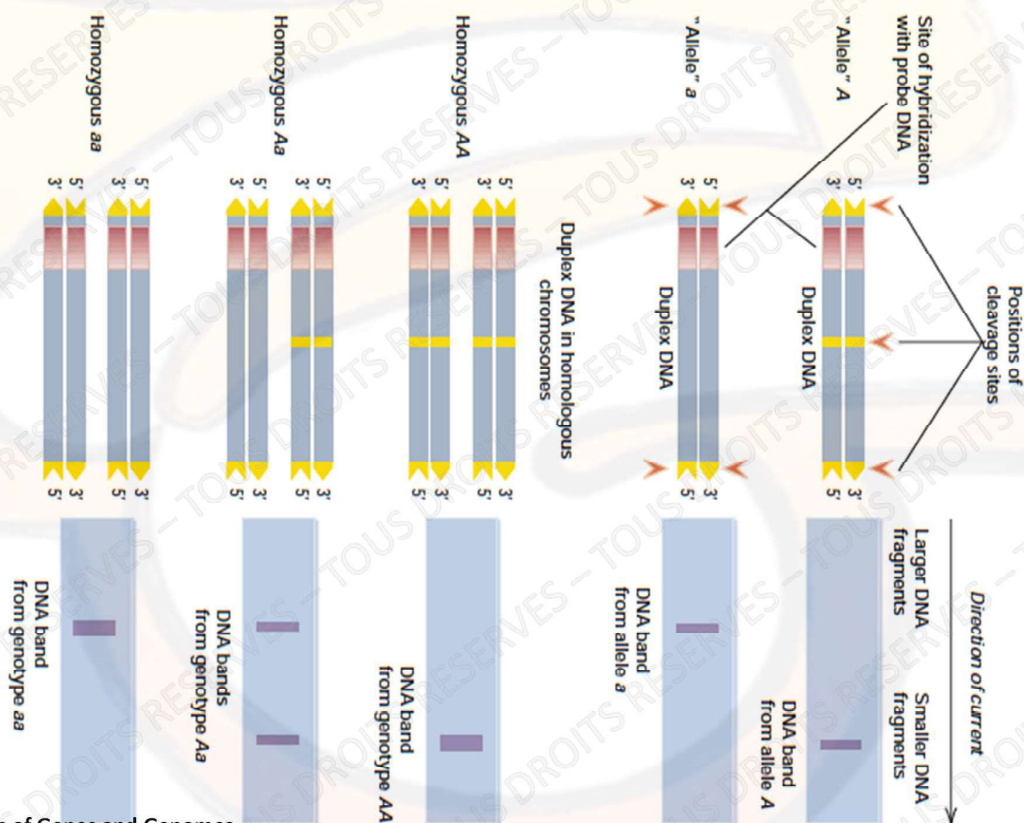


Figure 2.23 A minor difference in the DNA sequence of two molecules can be detected if the difference eliminates a restriction site. (A) This molecule contains three restriction sites for *Eco*RI, including one at each end. It is cleaved into two fragments by the enzyme. (B) This molecule has an altered *Eco*RI site in the middle, in which 5'-GAATTC-3' becomes 5'-GAACTC-3'. The altered site cannot be cleaved by *Eco*RI, so treatment of this molecule with *Eco*RI results in one larger fragment.

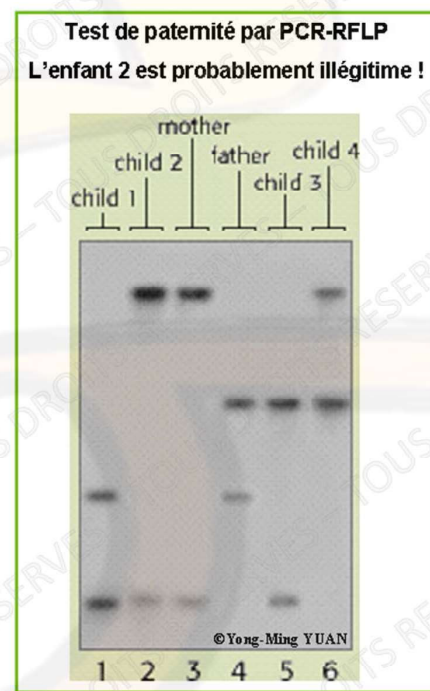
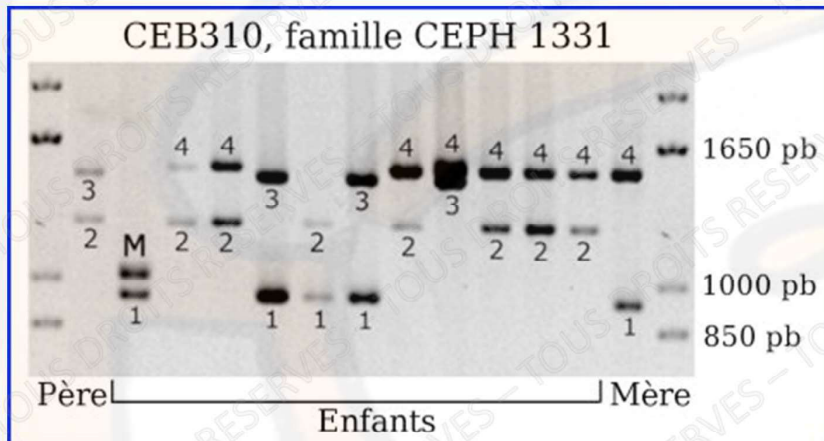
from: Genetics: Analysis of Genes and Genomes
D.L. Hartl and E.W. Jones

RFLP



from: Genetics: Analysis of Genes and Genomes
D.L. Hartl and E.W. Jones

Restriction Fragment Length Polymorphism



LES MICROSATELLITES

Découverts en 1989, ce type de marqueurs polymorphe va petit à petit remplacer les RFLP.

Il s'agit de séquences d'ADN constituées de motifs répétés à 2, 3 ou 4 nucléotides :

nnnnnnCACACACACACACACACACACACAnnnnnnnnn

nb variable de répétitions

nnnnnnGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTnnnnnnnnnn

nb variable de répétitions

nnnnnnATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGnnnnnn

nb variable de répétitions



LES MICROSATELLITES - marqueurs

Les microsatellites sont des marqueurs multi-alléliques

Allèle 1

...nnnnnnnnCACACACACACACACAnnnnnnnnnnnnn...
...nnnnnnnnCACACACACACACACAnnnnnnnnnnnnn...

Allèle 2

...nnnnnnnnnnCACACACACACACACACACACACAnnnnnnnnn...
...nnnnnnnnnnCACACACACACACACACACACACAnnnnnnnnn...

Allèle 3

...nnnnnnnnnnCACACACACACACACACACACAnnnnnnnnn...
...nnnnnnnnnnCACACACACACACACACACACAnnnnnnnnn...



Marqueurs génétiques - définition

Modification structurale du DNA, statistiquement liée à un caractère héréditaire mais sans en être la cause.

La recherche diagnostique d'un marqueur permettra de conclure à la probabilité de l'existence d'un caractère lié statistiquement à ce marqueur.

Le diagnostic de la présence d'un marqueur conduira à évaluer un facteur de risque.



LES MICROSATELLITES - marqueurs

Le pourcentage d'hétérozygotie dans la population générale sera plus important que celui des marqueurs bi-alléliques.

Locus bi-allélique : A1, A2 (n = 2)

3 génotypes possibles : A1A1, A1A2, A2A2

$$\begin{aligned}\text{Fréquence des hétérozygotes} &= 1 - (n \times f(A1) \times f(A2)) \\ &= 1 - (2 \times 0,5 \times 0,5) \\ &= 0,5\end{aligned}$$

50% d'hétérozygotes au maximum



LES MICROSATELLITES - marqueurs

Locus multi-allélique : A1, A2, A3, A4..... An (n allèles)

Nombre de génotypes homozygotes = n

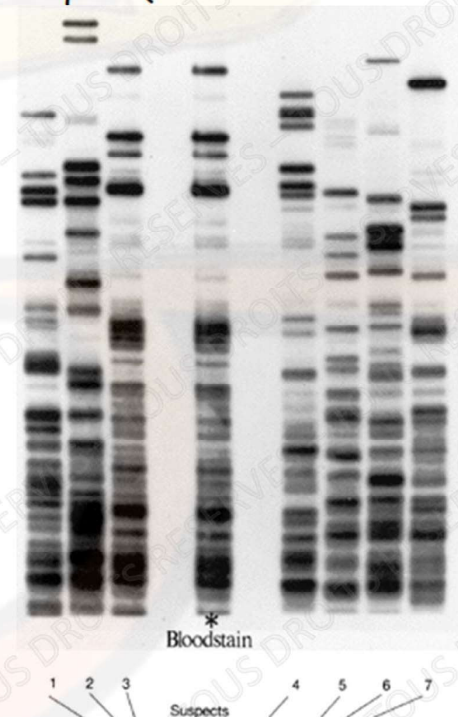
Nombre de génotypes possibles = $n \times (n+1) / 2$

Pour un marqueur à 8 allèles = $8 \times (8+1) / 2 = 36$ génotypes
(avec seulement 8 génotypes homozygotes)

$$\begin{aligned}\text{Fréquence des hétérozygotes} &= 1 - (8 \times 0,125 \times 0,125) \\ &= 0,875\end{aligned}$$

87,5% d'hétérozygotes au maximum (pour 8 allèles)

- Peu utilisés pour la construction de cartes génétiques
- Souvent utilisés pour établir des empreintes génétiques (*DNA fingerprints*) chez de nombreux organismes



Marqueurs génétiques - définition

Modification structurale du DNA, statistiquement liée à un caractère héréditaire mais sans en être la cause.

La recherche diagnostique d'un marqueur permettra de conclure à la probabilité de l'existence d'un caractère lié statistiquement à ce marqueur.

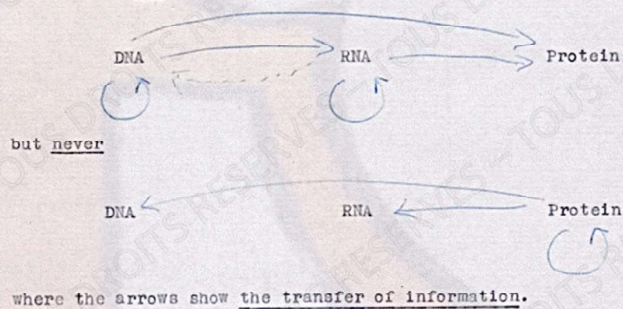
Le diagnostic de la présence d'un marqueur conduira à évaluer un facteur de risque.

Notion de **CARTOGRAPHIE**

F.C. Crick, 1958: "the central dogma* in molecular biology"



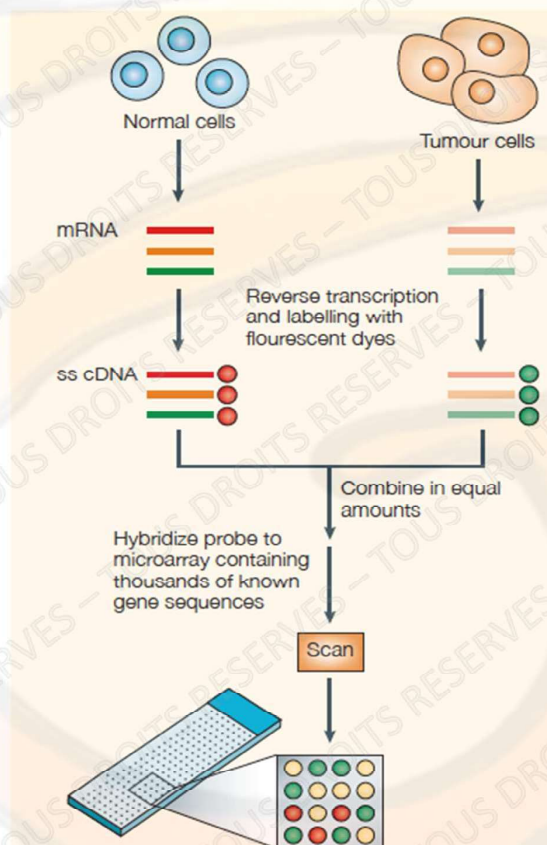
The Central Dogma: "Once information has got into a protein it can't get out again". Information here means the sequence of the amino acid residues, or other sequences related to it. That is, we may be able to have



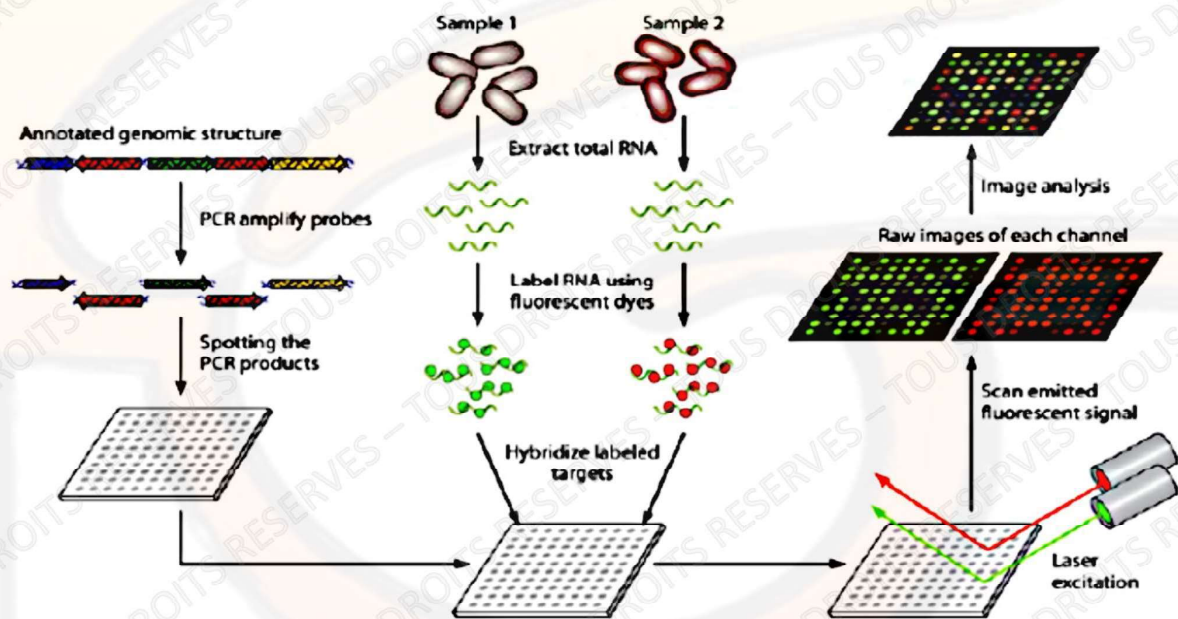
Crick's first outline of the central dogma, from an unpublished note made in 1956. Credit: Wellcome Library, London.



Credit: Cold Spring Harbor Laboratory



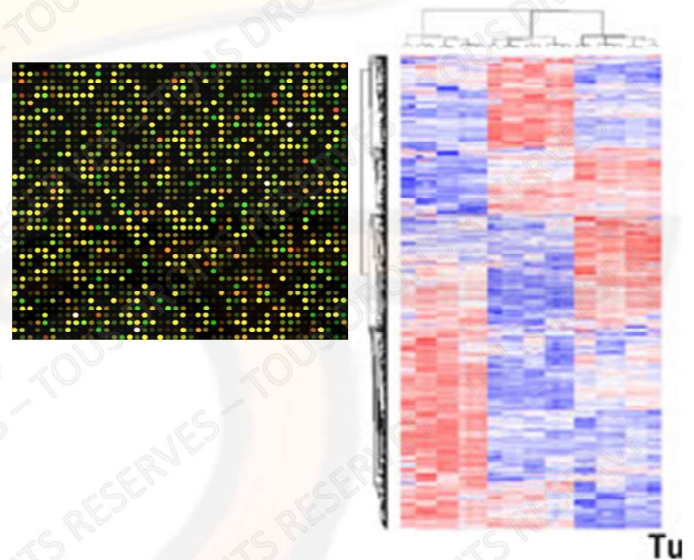
Hybridation compétitive sur *microarrays*



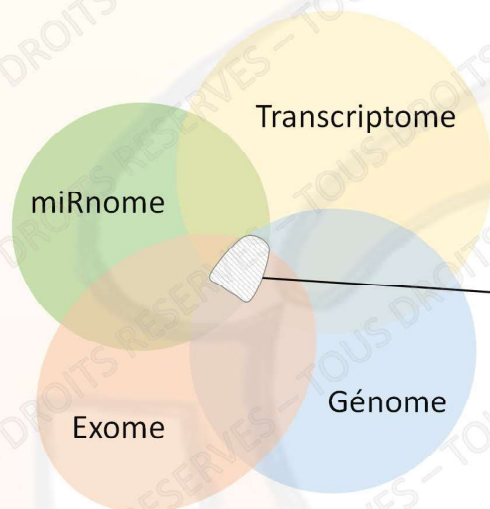
Miller & Tang, *Clin. Microbiol. Rev* (2009)

Applications des analyses en microarrays:

- 1- Identifier des gènes dont l'expression est modifiée entre échantillons expérimentaux
- 2- organiser des échantillons selon leurs profils d'expression
- 3- Etablir des profils d'expression : grouper des gènes dont l'expression change de manière coordonnées selon des traitements, des maladies ou des étapes de maladies.
- 4- Détection de mutations/polymorphismes (SNPs)
- 5- Analyse de pathogènes



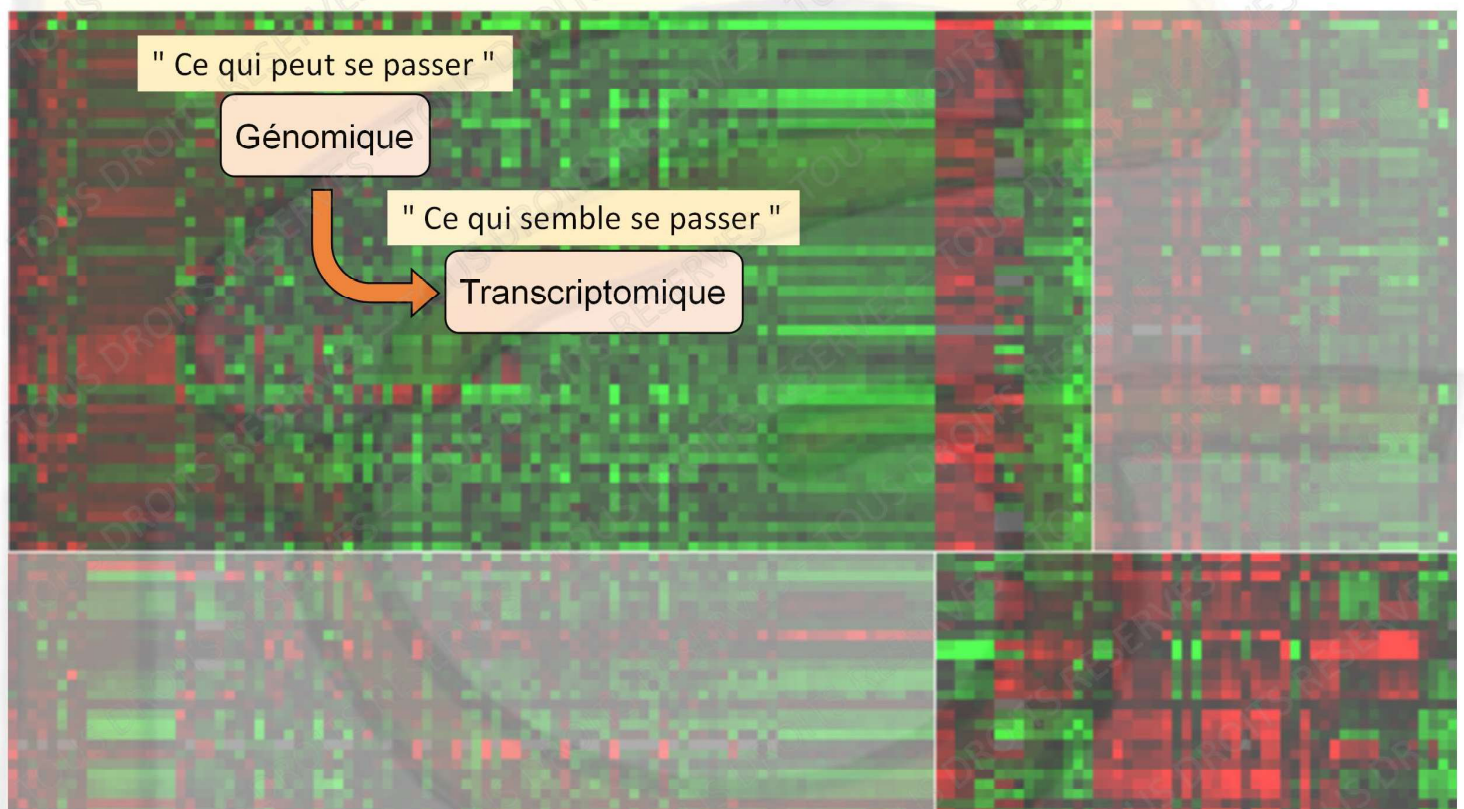
Tu

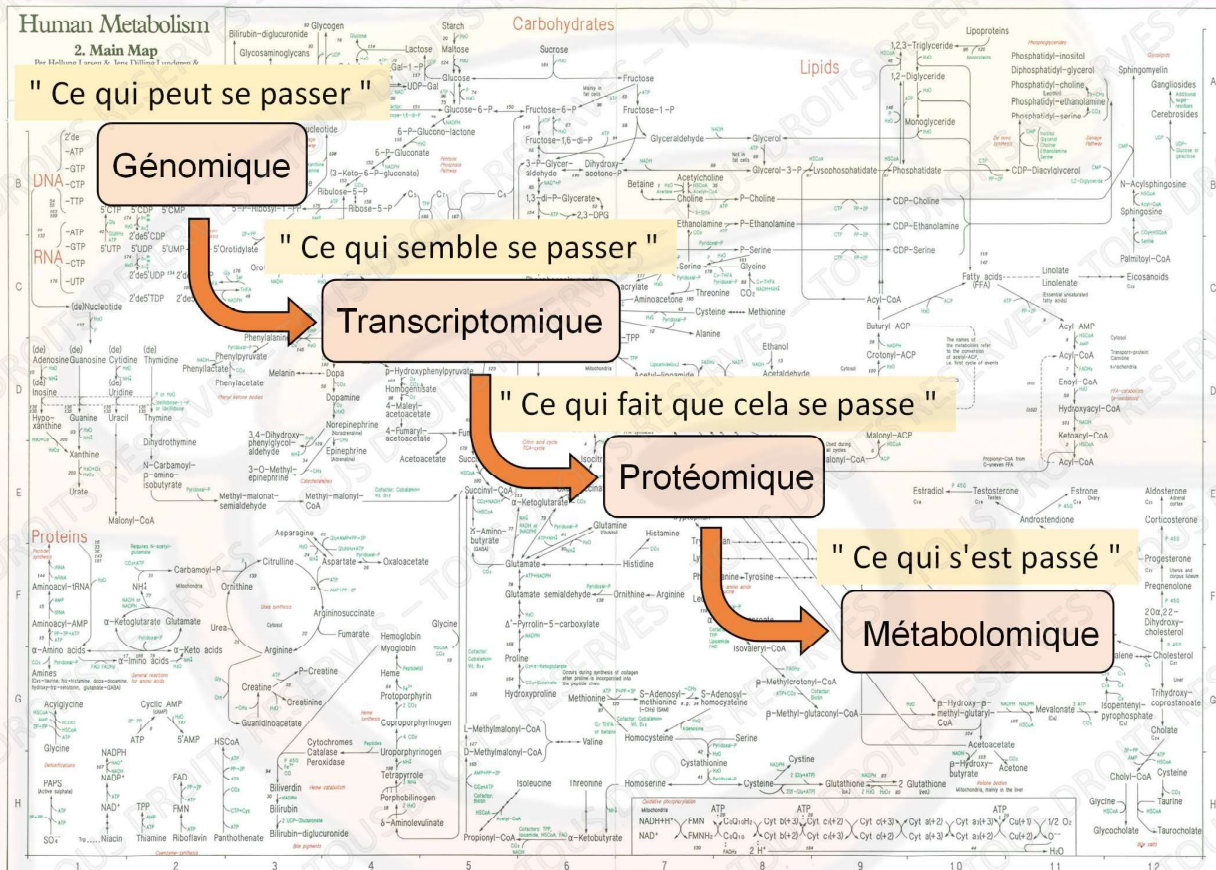
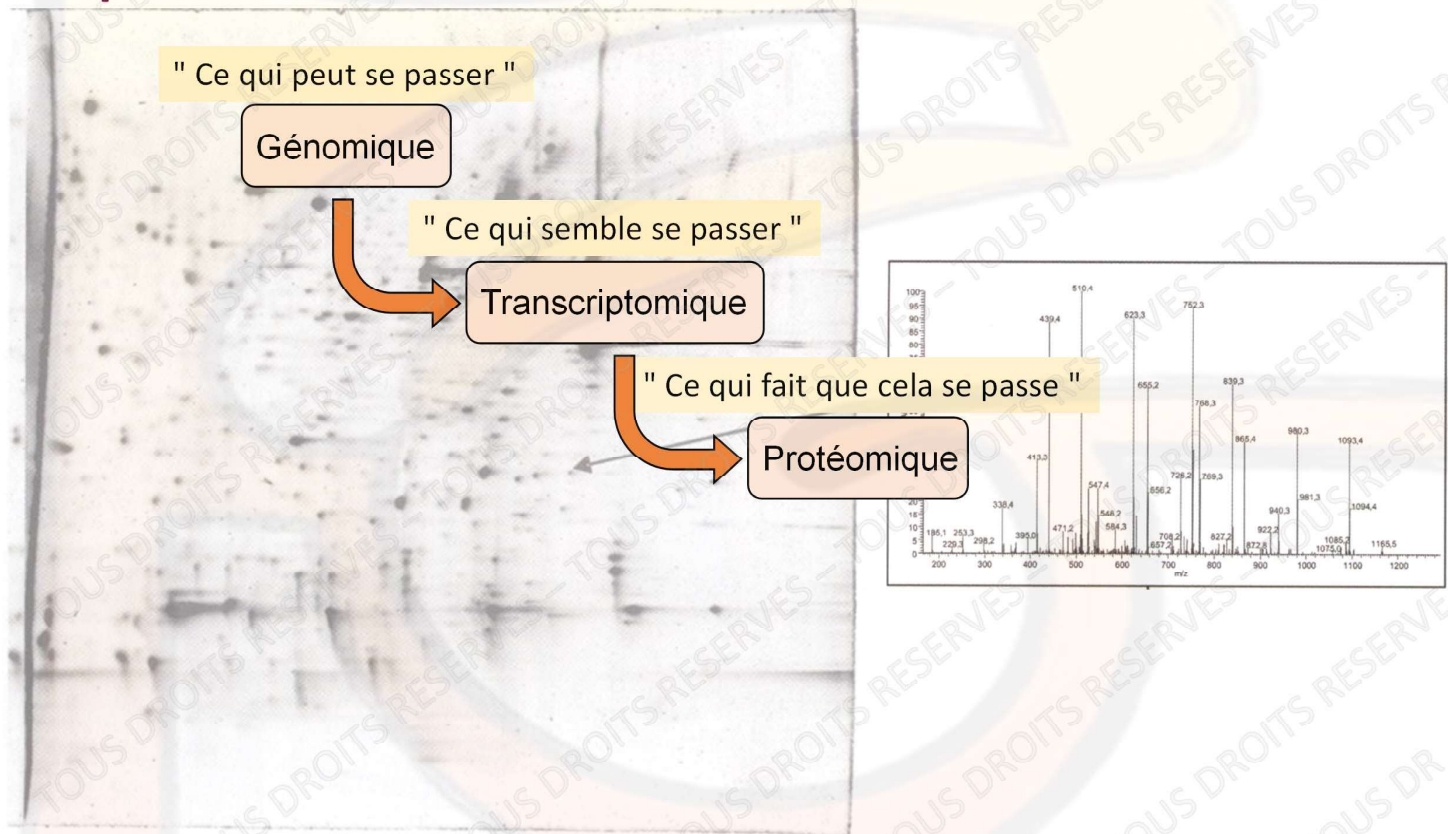


Accumulation de multitudes de données dont le recoupement permet de réaliser des "signatures" type et permet l'orientation vers une médecine "personnalisée".



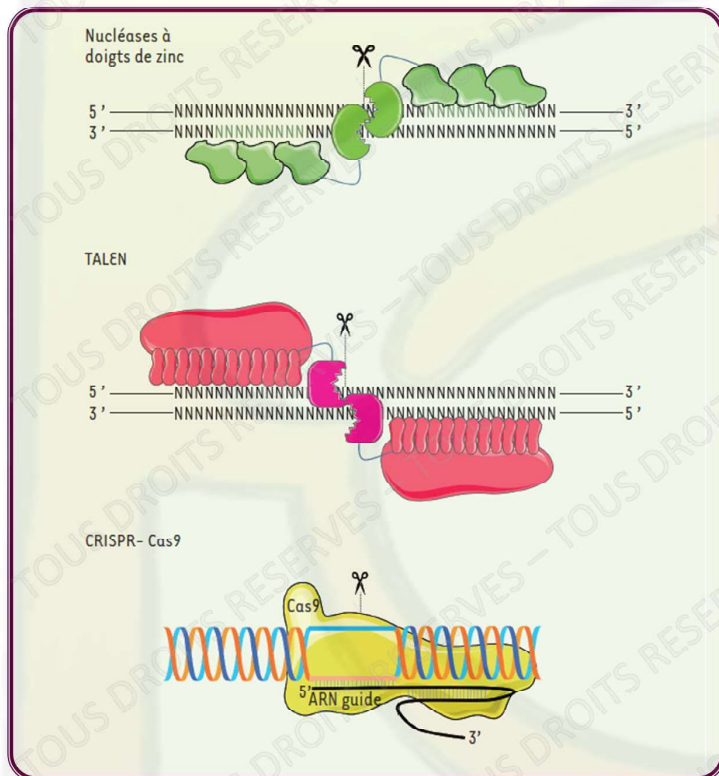
La cascade des "omiques" – la redécouverte du métabolisme



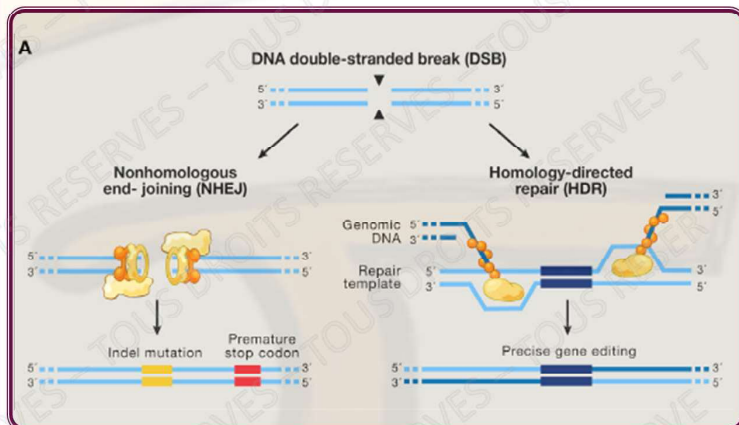




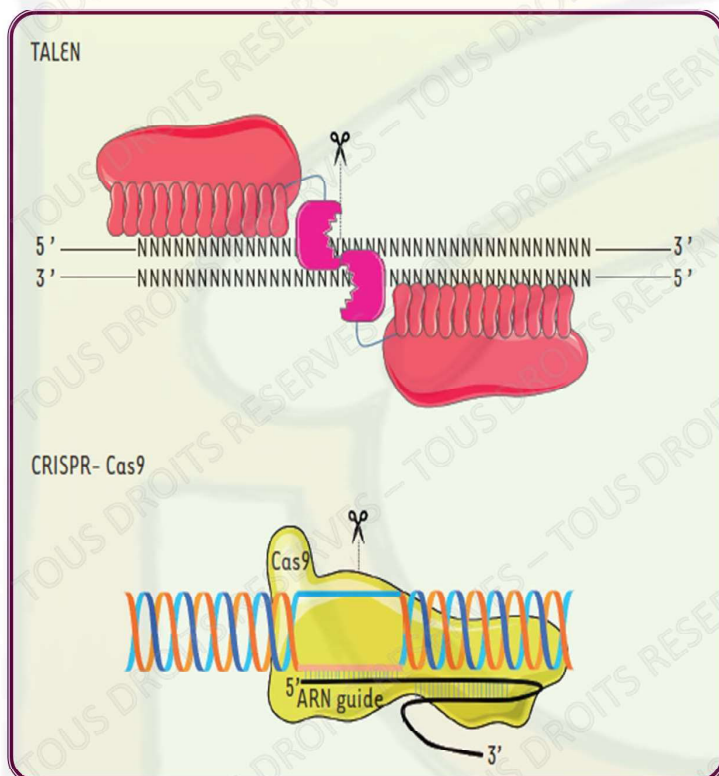
Edition du génome



médecine/sciences 2019 ; 35 : 309-15

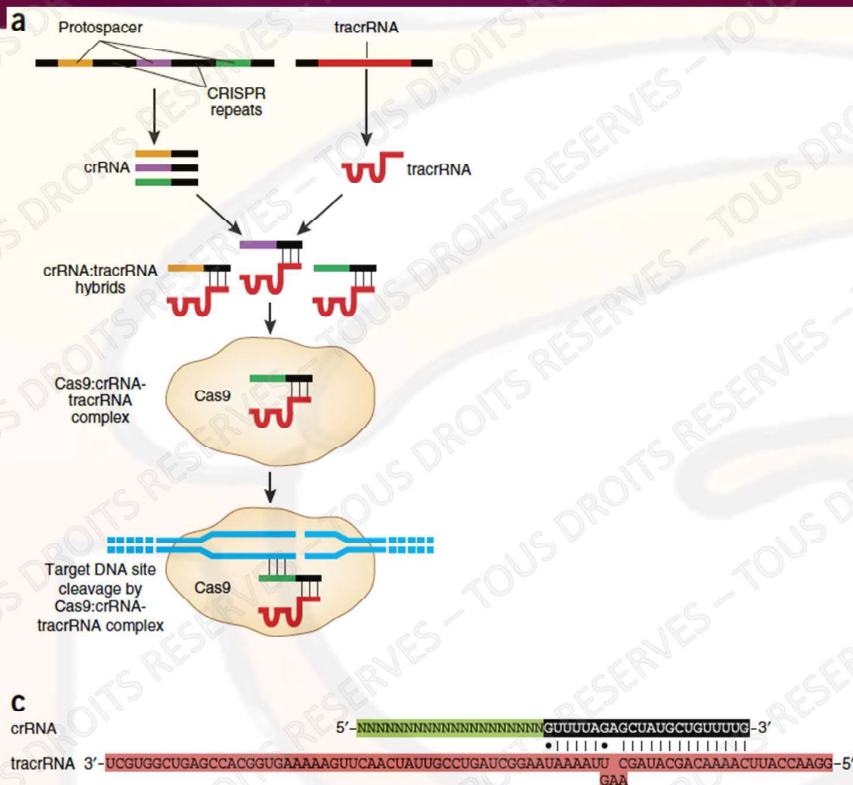


Edition du génome



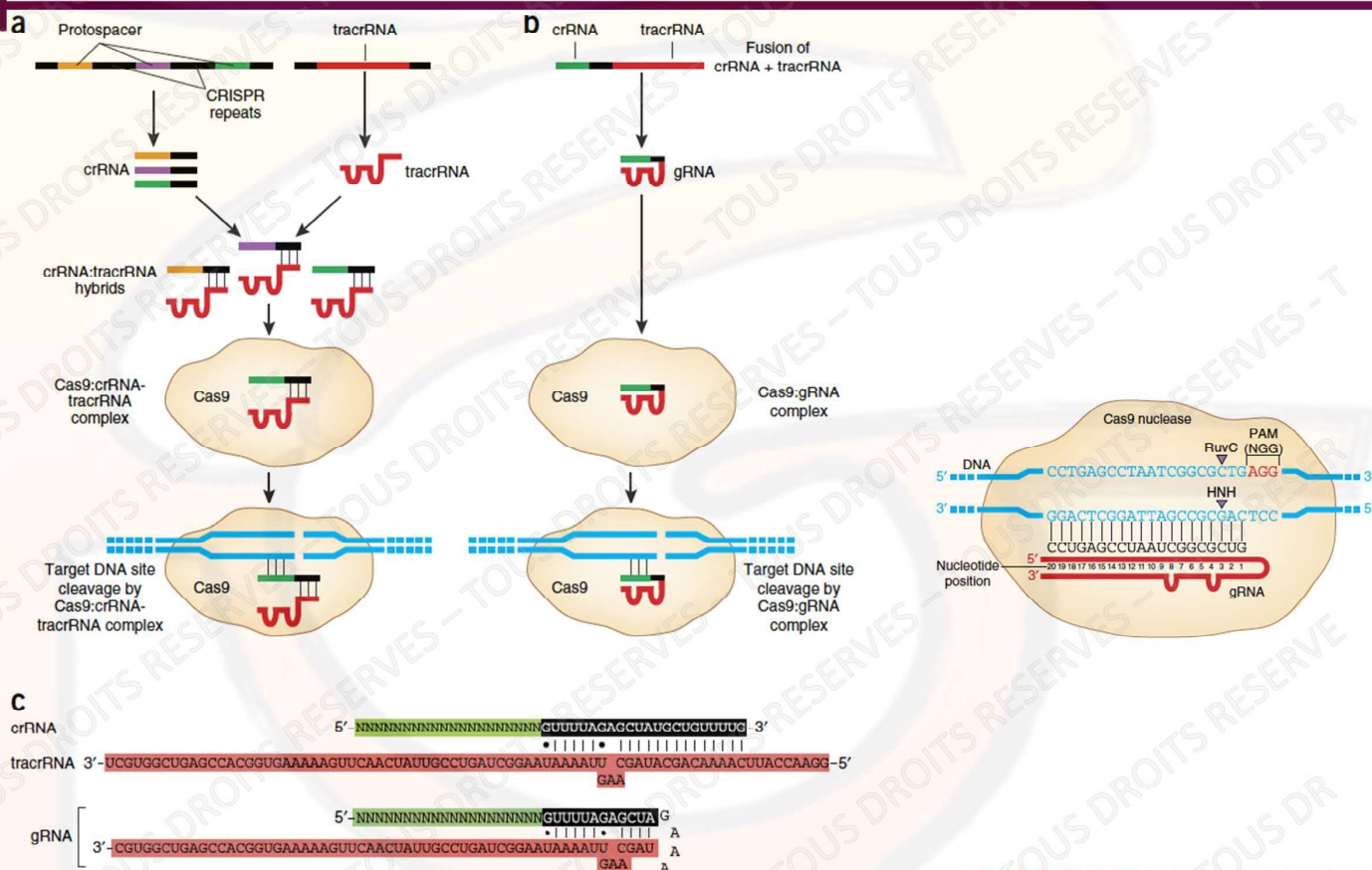
médecine/sciences 2019 ; 35 : 309-15

Genome editing – le système CRSPR/Cas9



NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 32 NUMBER 4 APRIL 2014

Genome editing – le système CRSPR/Cas9



NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 32 NUMBER 4 APRIL 2014

Modèle utilisé	Recombinaison Homologue en cellules ES	CRISPR/Cas9
Avantages	• Knock in dans le génome avec des séquences de grande taille ($\geq 4b$) peut-être réalisé de manière plus directe. • Technique et méthodologie bien maîtrisées et documentées.	• Ne nécessite pas de croisements congéniques. N'importe quel fond génétique peut être ciblé. • Ne nécessite pas de cellules ES. Les mutations peuvent être introduites directement dans l'embryon. • Possibilité d'introduire plusieurs mutations de manière assez directe.
Limites	• Chronophage et coûteux. Principalement à cause des coûts de zootechnie. • Ne peut être réalisé que sur quelques fonds génétiques. • Méthodologie très technique.	• Knock-in de longues séquences moins efficace. • Mosaïcisme • Problème de off-target.

Thérapie Génique et outils futurs

Thérapie génique germinale et somatique

Thérapie génique germinale :



- recombinaison homologue entre deux gènes
- gène sain qui remplace gène pathologique
- invalidation d'un gène

=> microinjection d'ADN dans un embryon

Thérapie génique somatique :

- modification génique d'un groupe de cellules voire d'un organe entier



Organisation
des Nations Unies
pour l'éducation,
la science et la culture



Comité international
de bioéthique (CIB)

SHS/YES/IBC-22/15/2 REV.2
Paris, 2 octobre 2015
Original : anglais / français

Distribution : limitée

Un panel de l'UNESCO composé de scientifiques, de philosophes, de juristes et de ministres a appelé à une interdiction temporaire de « l'ingénierie » génétique de la lignée germinale humaine, appelant à un débat public plus large sur les modifications génétiques de l'ADN humain.

...Dans ce rapport, les experts soulignent que « la thérapie génique pourrait être un bond en avant dans l'histoire de la médecine et que l'ingénierie des génomes est sans doute l'une des entreprises les plus prometteuses de la science pour le bien de l'humanité toute entière ».

Mais le rapport du CIB (Comité international de bioéthique) avertit que « cette révolution semble nécessiter des précautions particulières et soulève de graves inquiétudes, en particulier si l'ingénierie du génome humain devrait être appliqué à la lignée germinale en introduisant des modifications héréditaires, qui seraient transmises aux générations futures ».

Le CIB a donc appelé, lors de sa réunion, à un moratoire sur cette procédure spécifique sur le génome humain et les droits de l'homme.

« (...) les interventions sur le génome humain ne sont admises que pour des raisons préventives, diagnostiques ou thérapeutiques et sans apporter de modifications chez les descendants, » dit le CIB, faisant valoir que « l'alternative serait de mettre en péril la dignité inhérente et donc égale de tous les êtres humains et de faire renaître l'eugénisme ».

<https://fr.unesco.org/news/panel-dexperts-lunesco-demande-moratoire-lingenierie-ladn-humain-eviter-modifications>

Pour votre culture ... et votre réflexion : La conférence d'Asilomar, 1974

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 72, No. 6, pp. 1981-1984, June 1975

Summary Statement of the Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules*

PAUL BERG†, DAVID BALTIMORE‡, SYDNEY BRENNER§, RICHARD O. ROBLIN III¶, AND
MAXINE F. SINGER||

Organizing Committee for the International Conference on Recombinant DNA Molecules, Assembly of Life Sciences, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 20418. † Chairman of the committee and Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California; ‡ American Cancer Society Professor of Microbiology, Center for Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass.; § Member, Scientific Staff of the Medical Research Council of the United Kingdom, Cambridge, England; ¶ Professor of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, and Assistant Bacteriologist, Infectious Disease Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Mass.; and || Head, Nucleic Acid Enzymology Section, Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

The new techniques, which permit combination of genetic information from very different organisms, place us in an area of biology with many unknowns. Even in the present, more limited conduct of research in this field, the evaluation of potential biohazards has proved to be extremely difficult. It is this ignorance that has compelled us to conclude that it would be wise to exercise considerable caution in performing this research.

But it was also recognized that future research and experience may show that many of the potential biohazards are less serious and/or less probable than we now suspect.

Although our assessments of the risks involved with each of the various lines of research on recombinant DNA molecules may differ, few, if any, believe that this methodology is free from any risk. Reasonable principles for dealing with these potential risks are: (i) that containment be made an essential consideration in the experimental design and, (ii) that the effectiveness of the containment should match, as closely as possible, the estimated risk.



Comité Consultatif National d'Éthique

Pour les sciences de la vie
et de la santé

Rechercher



<https://etatsgenerauxdelabioethique.fr>

Merci de votre attention

franck.gesbert@u-psud.fr