

2022-2023

2024.2

Biologie Moléculaire des Génomes

Organisation, Maintien et Expression

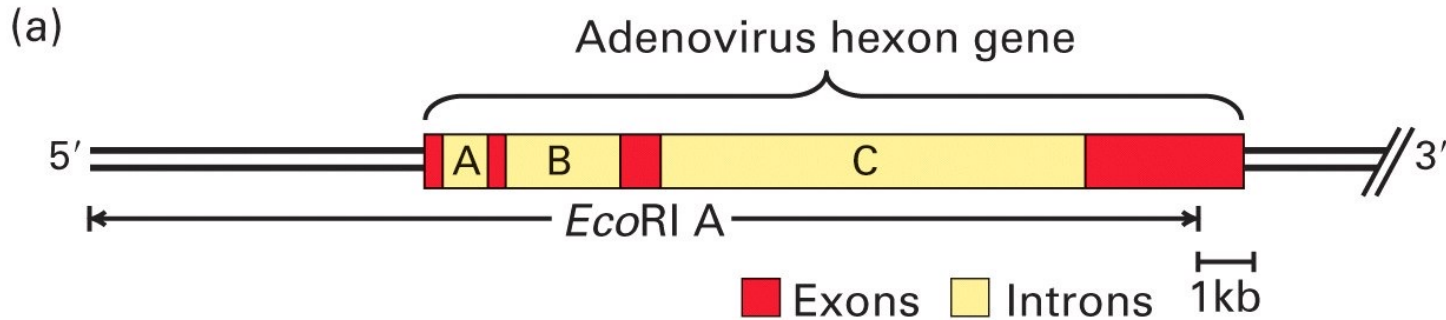
L3

Cours	Enseignant
Réplication & topologie (4h)	C Vélot
Stabilité / dynamique des génomes (2h)	D Gautheret
Régulations transcriptionnelles (3h)	"
Régulation par l'épissage (2h)	"
Traduction et NMD (3h)	"
Régulation par les ARN (2h)	"

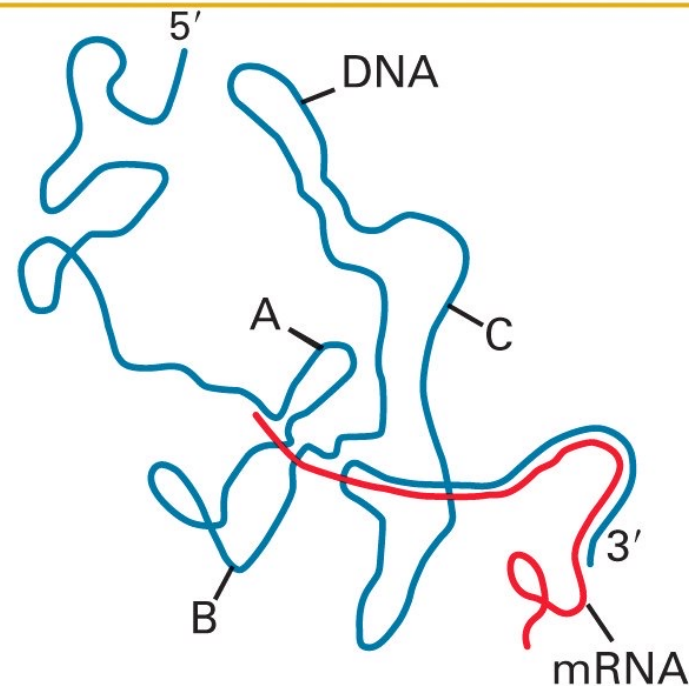
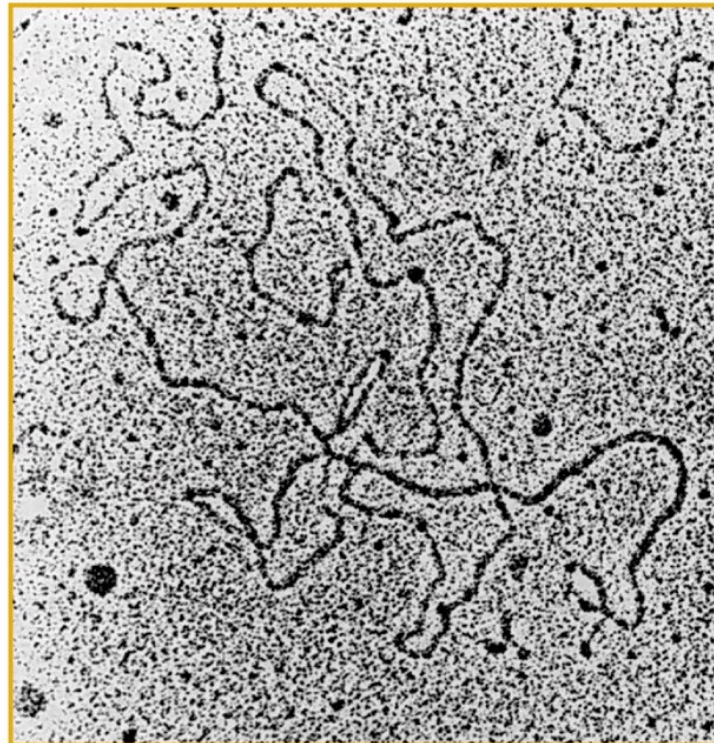
Régulation par l'épissage des ARNm

Rappels de L2 sur l'épissage...

Les expériences qui démontrent la discontinuité : Le génome de l'Adénovirus contient des gènes fragmentés.

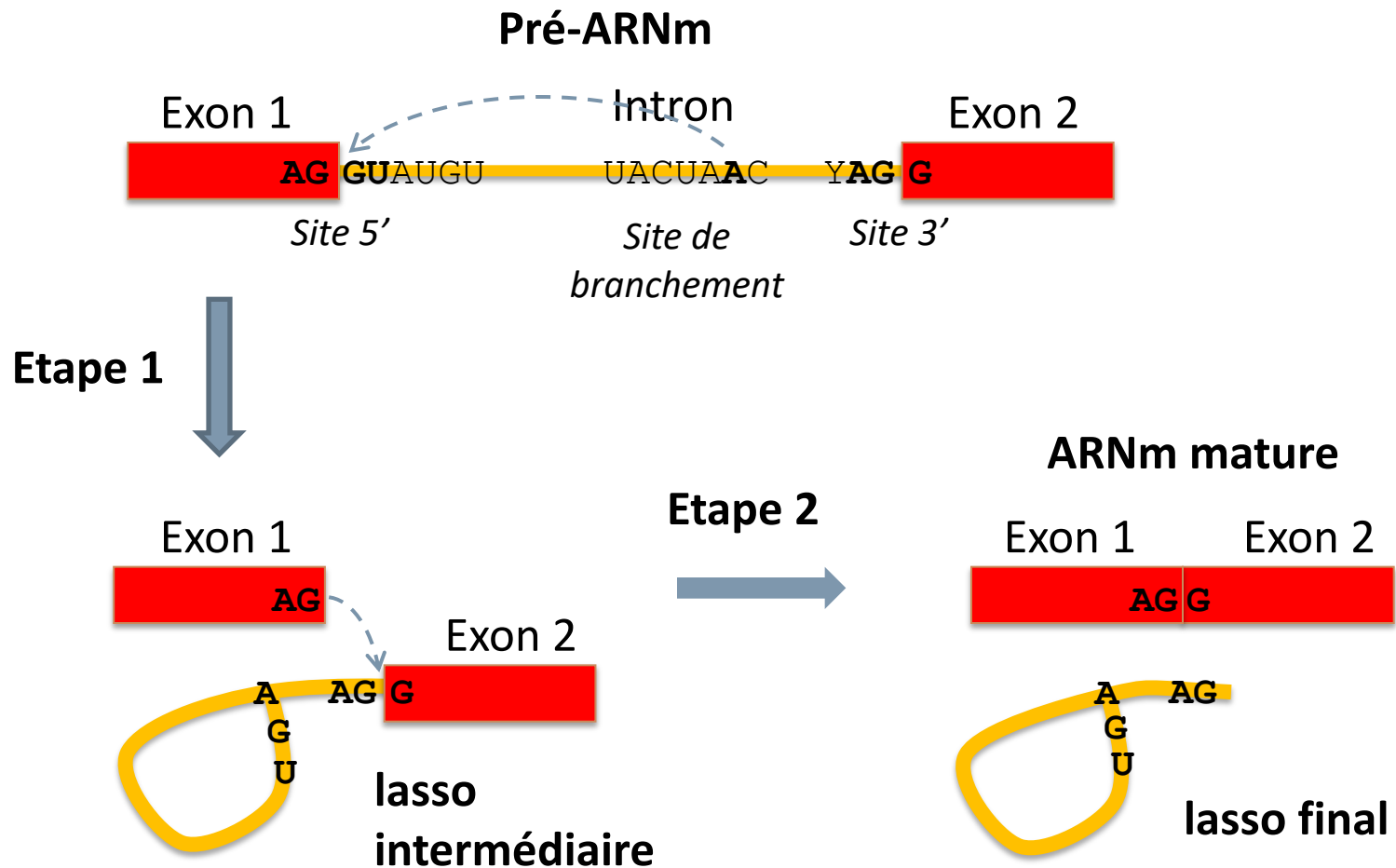


(b)

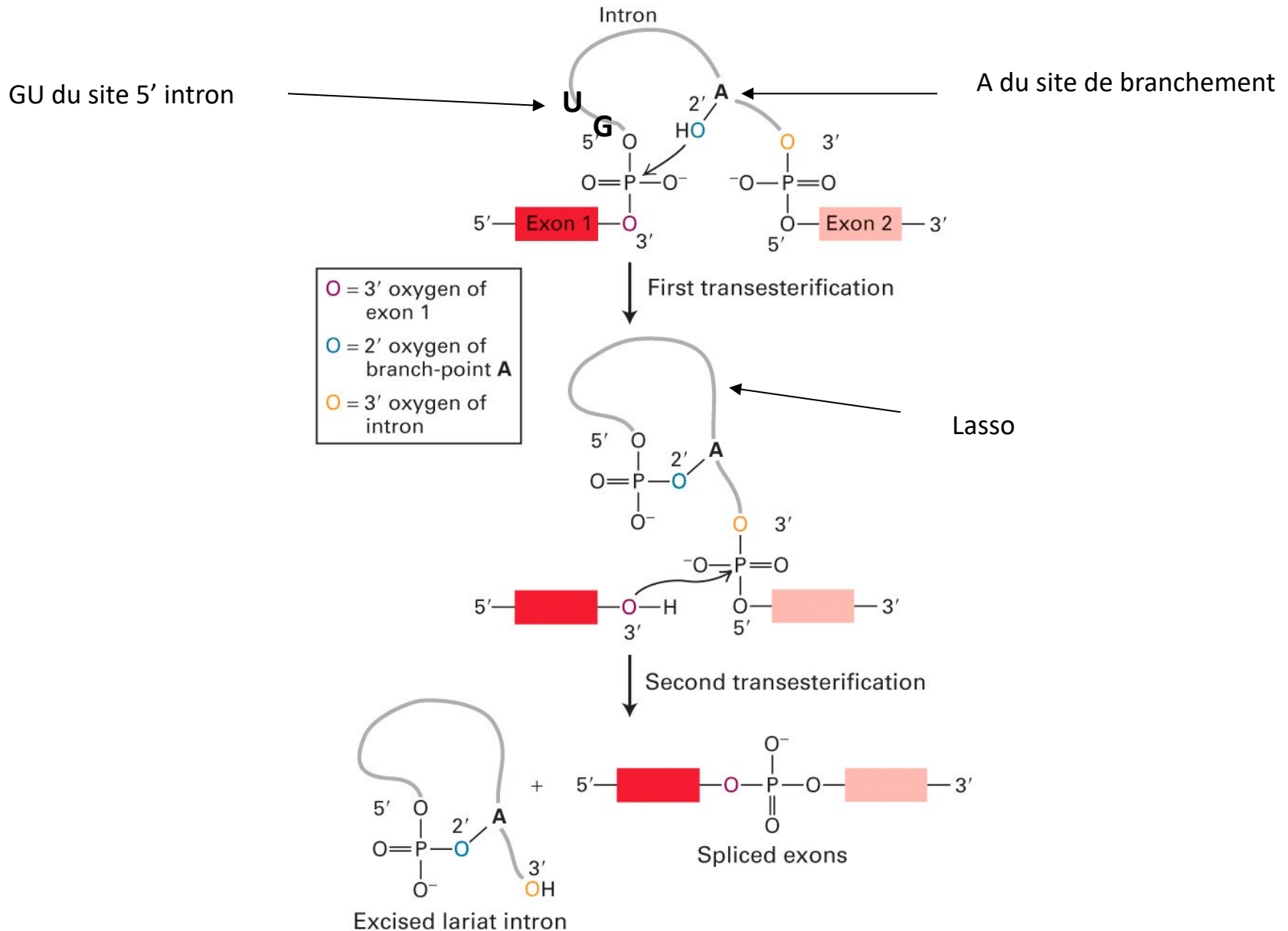


Phil Sharp

Les deux étapes de la réaction catalytique d'épissage



Les deux réactions de transestérification

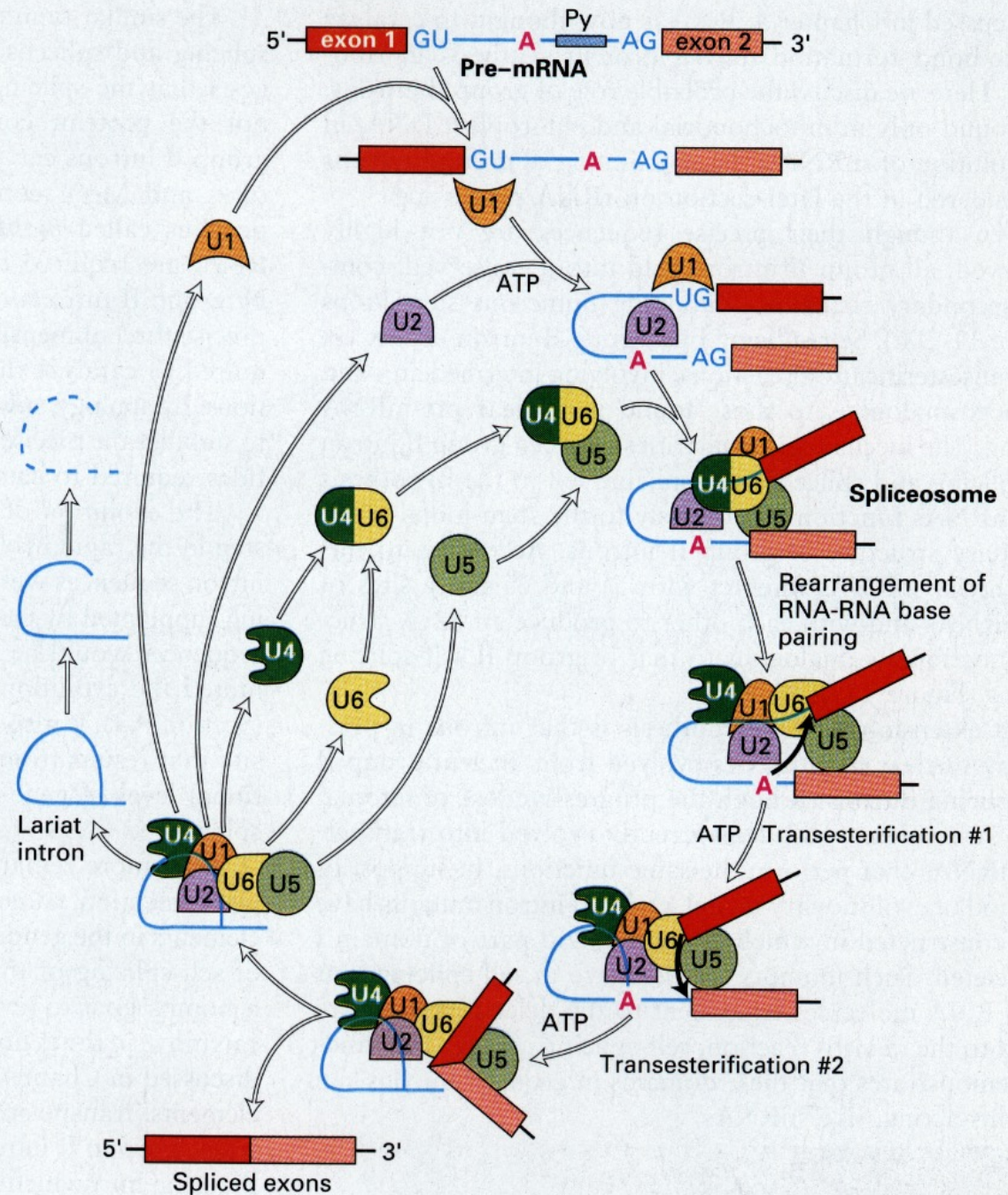


L'épissage est réalisé par un complexe ribonucléoprotéique: le spliceosome

U_x=snRNP
=snRNA+Protéines

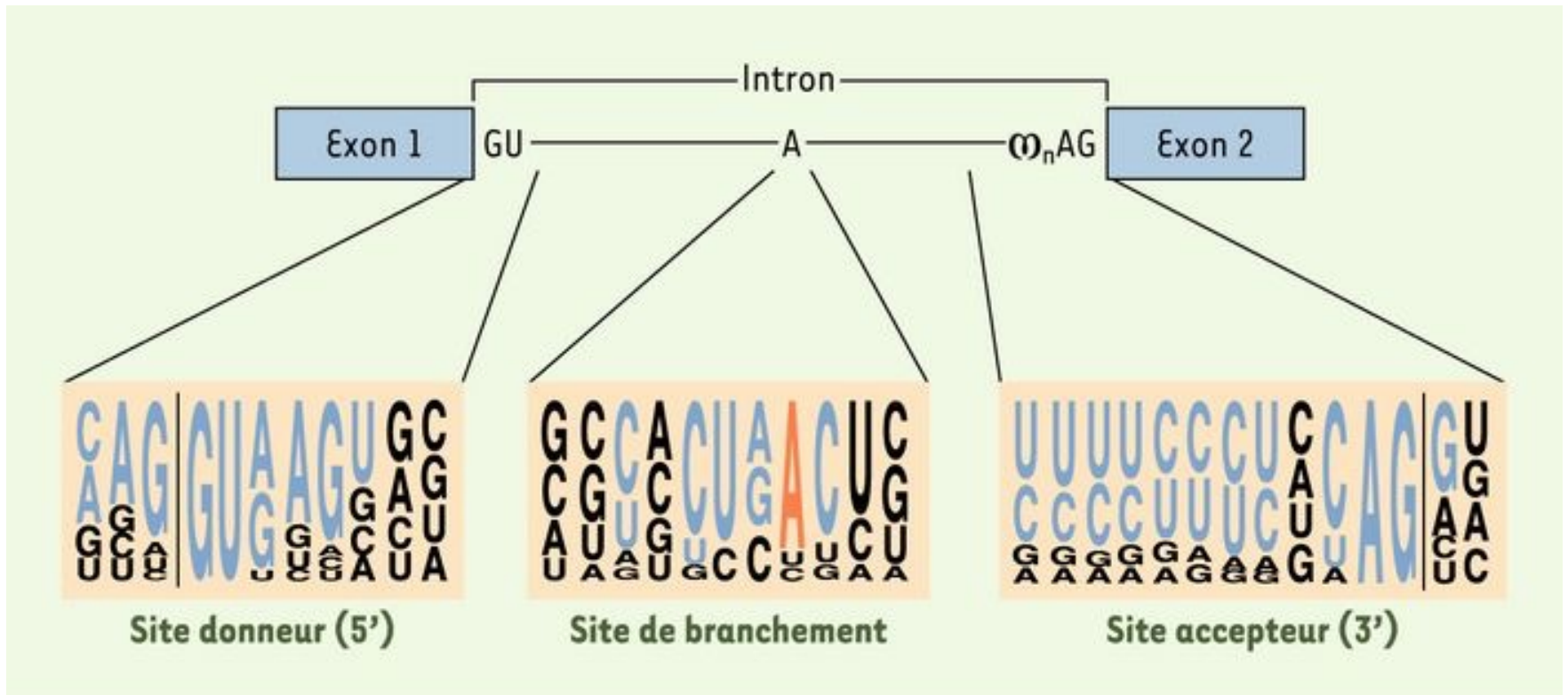
Small nuclear RNA

FORMATION ET RECYCLAGE DU
SPliceOSOME

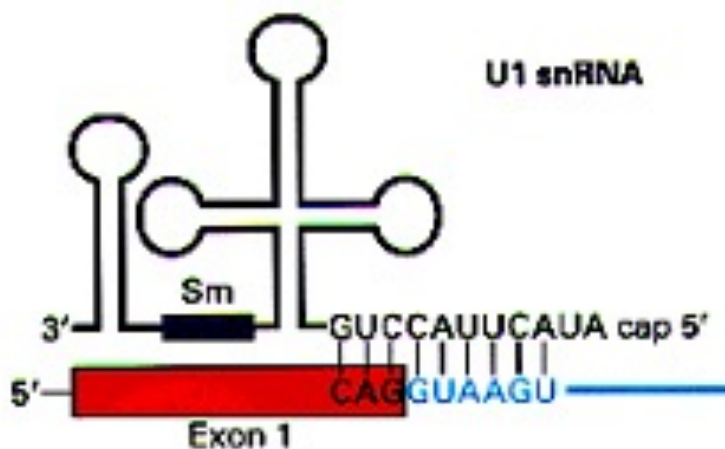


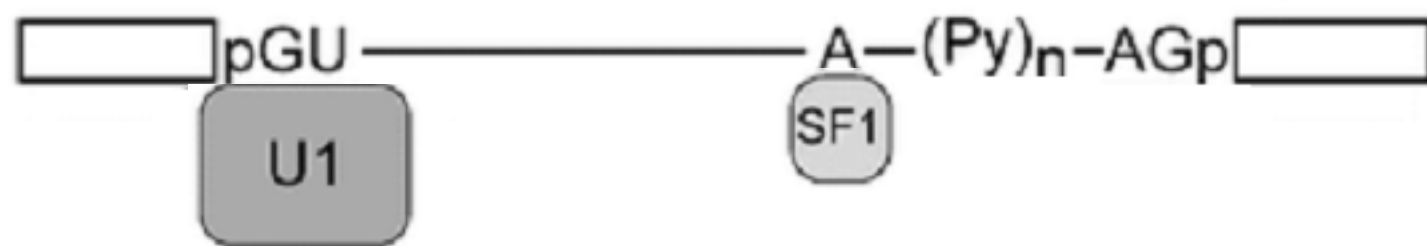
Définition de l'exon

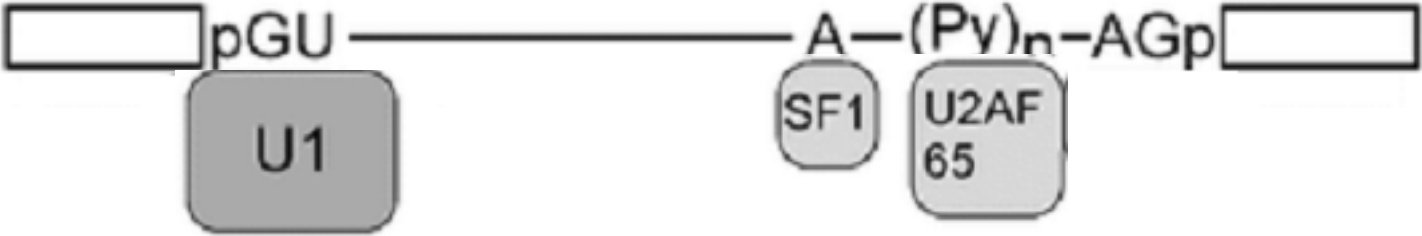
- “Définition de l'exon” = reconnaissance d'un segment de pré-mRNA en tant qu'exon par le spliceosome.



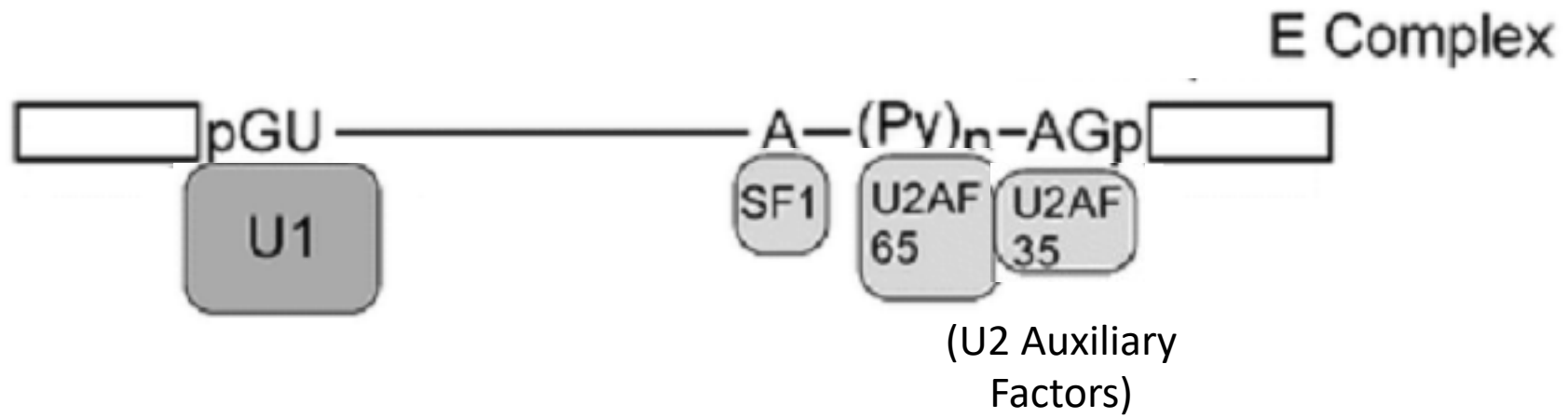








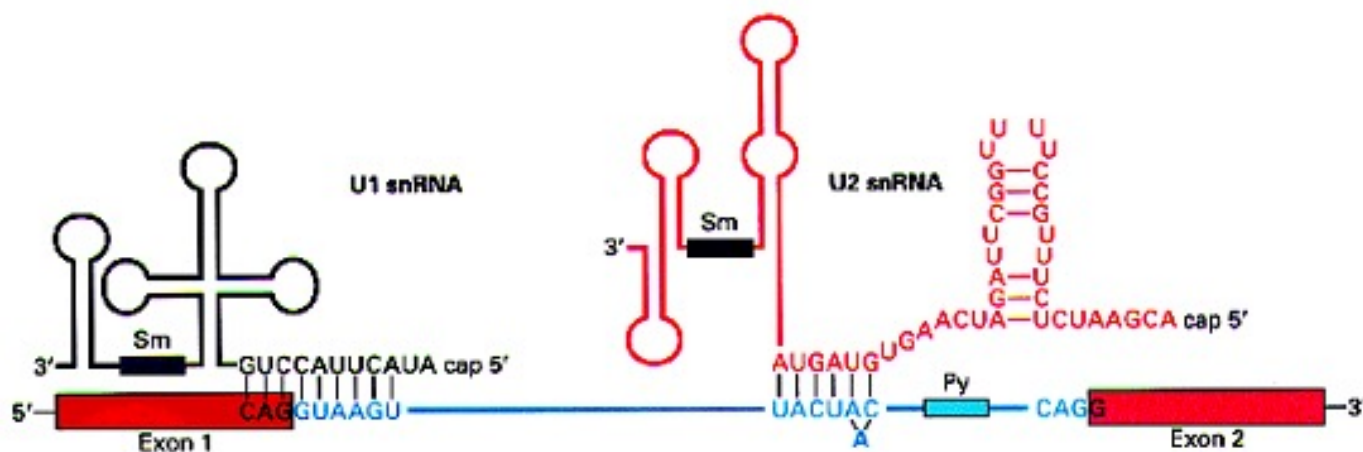
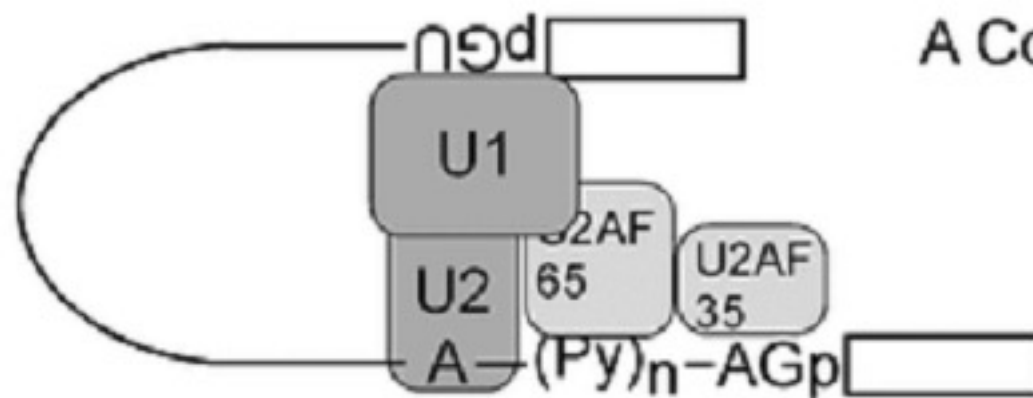
(U2 Auxiliary
Factors)

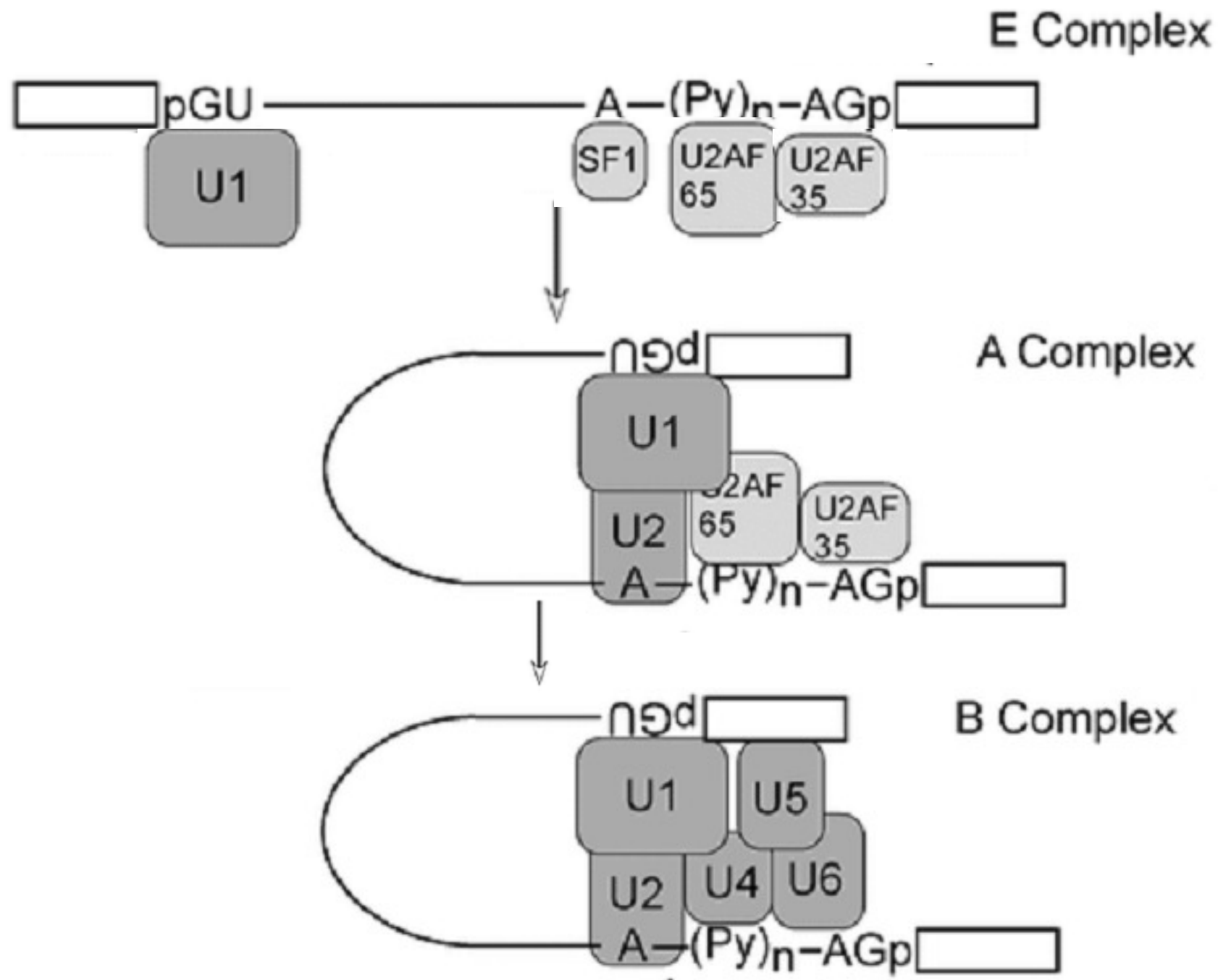


E Complex

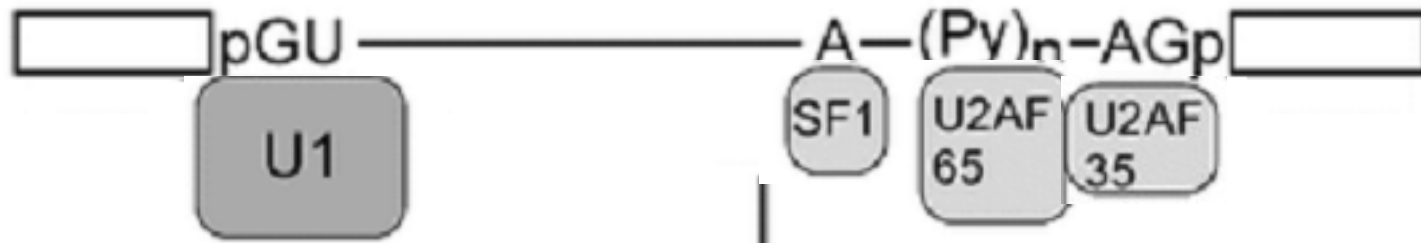


A Complex

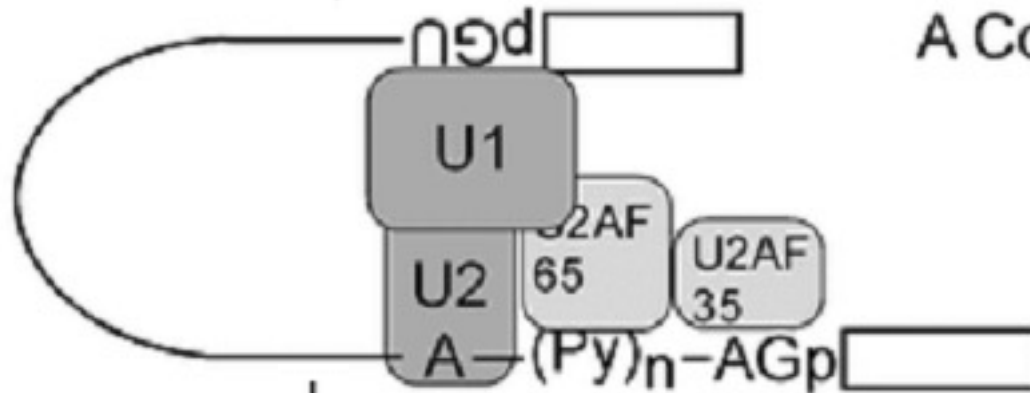




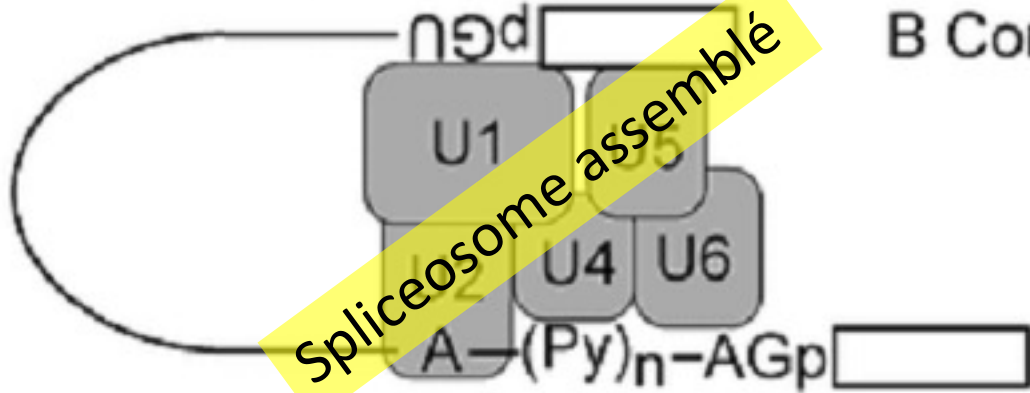
E Complex



A Complex



B Complex



transestérifications



Spliceosome assemblé

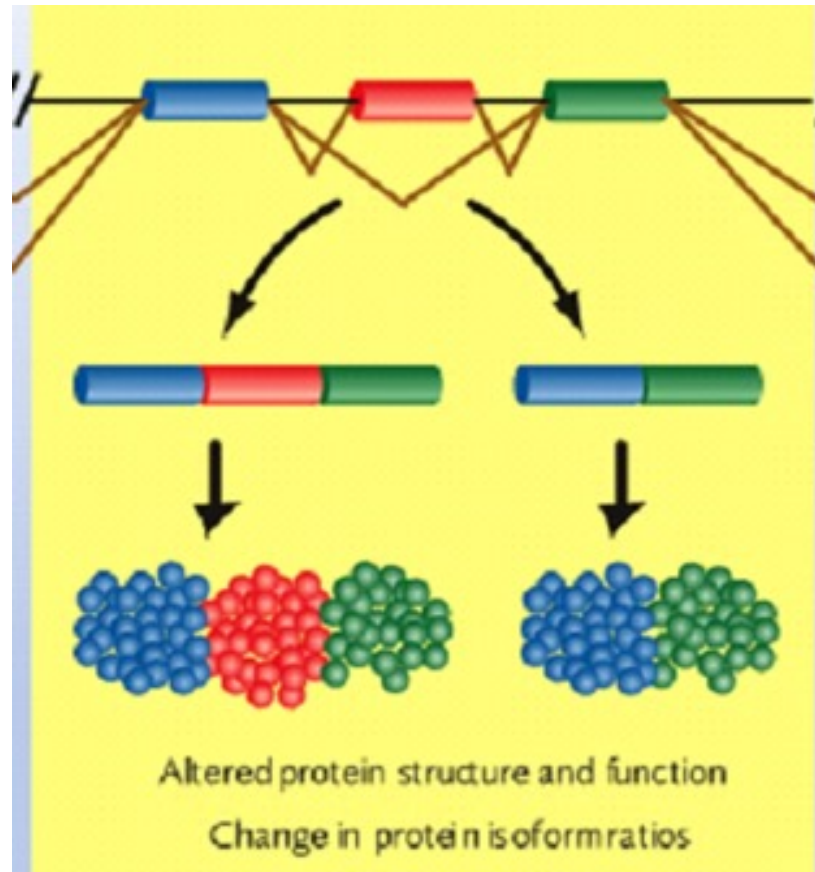
Epissage alternatif

20.000 gènes codants dans le génome humain

- 20.000 gènes ne signifie pas 20.000 protéines!
- Par épissage alternatif: 1 gène -> plusieurs protéines
- la fraction des gènes donnant lieu à un épissage alternatif est >90 %
- Le nombre total de protéines est vraisemblablement environ 150.000 sinon plus...

Exons constitutifs et régulés

- Les **exons constitutifs** sont toujours inclus dans l'ARNm final
- Les **exons régulés** sont parfois inclus, parfois exclus



Signaux canoniques et auxiliaires



- Les signaux canoniques/consensus d'épissage recrutent le spliceosome:



Les signaux auxiliaires: éléments régulateurs

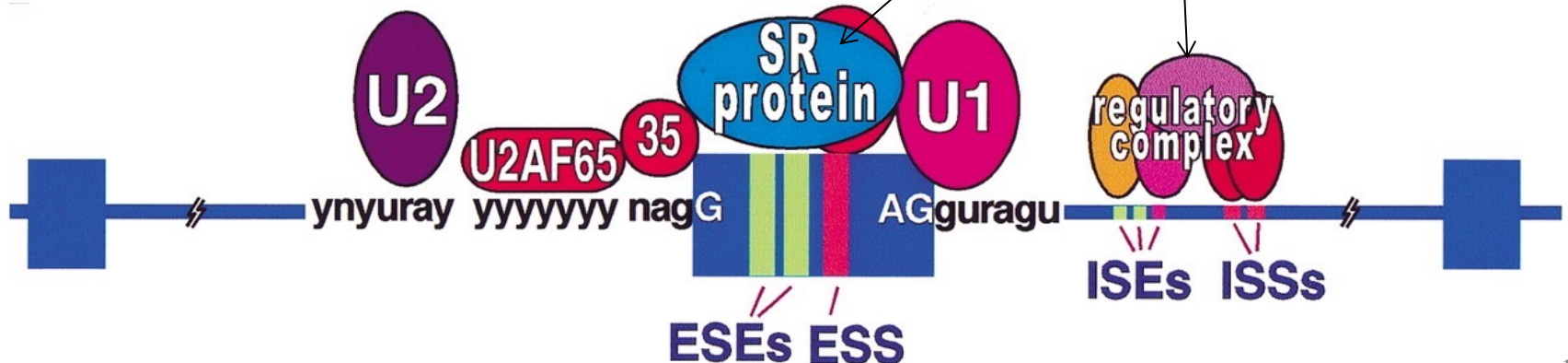
REGULATION POSITIVE :

- exonic splicing enhancers (ESE)
- intronic splicing enhancers (ISE)

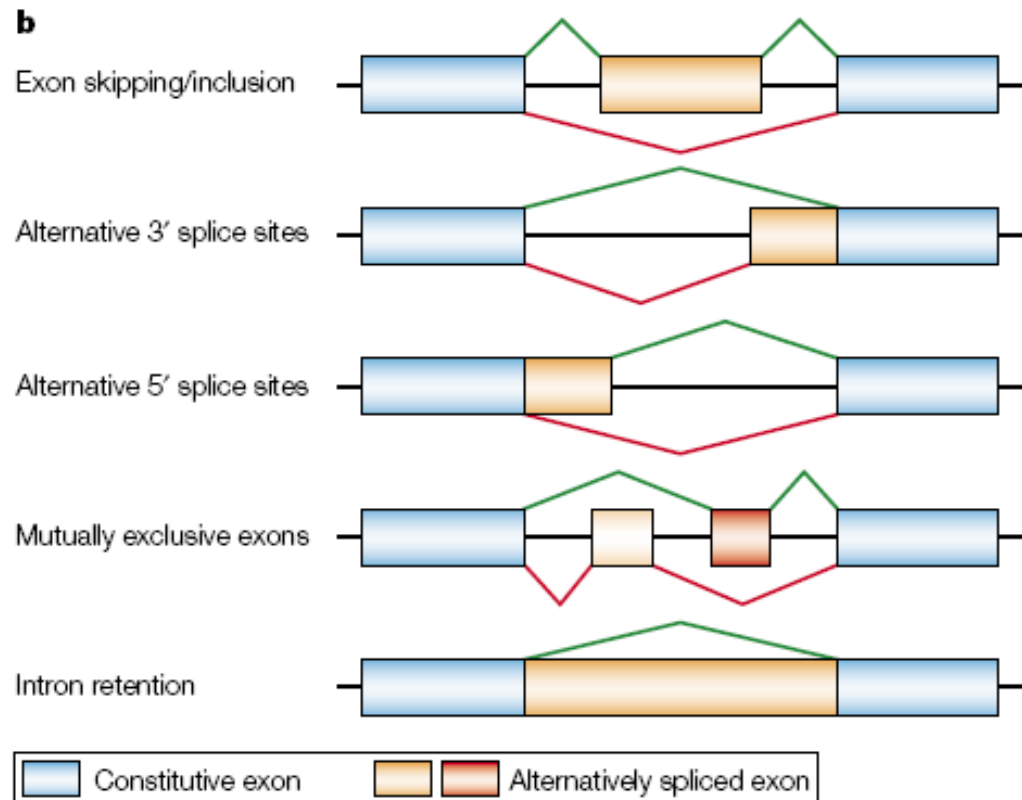
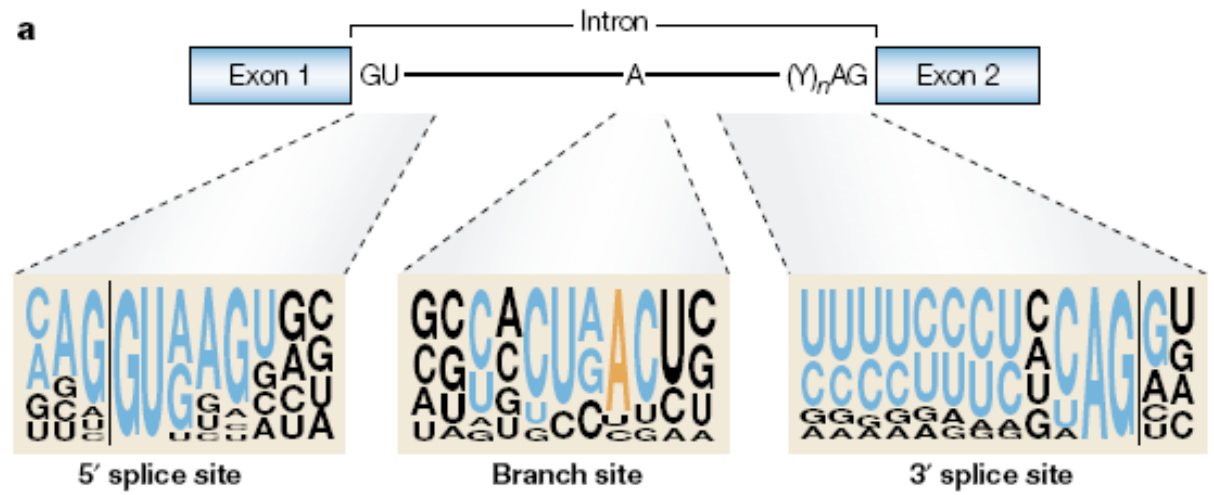
REGULATION NEGATIVE :

- exonic splicing silencers (ESS)
- intronic splicing silencers (ISS)

Facteurs d'épissage
(régulent l'épissage)

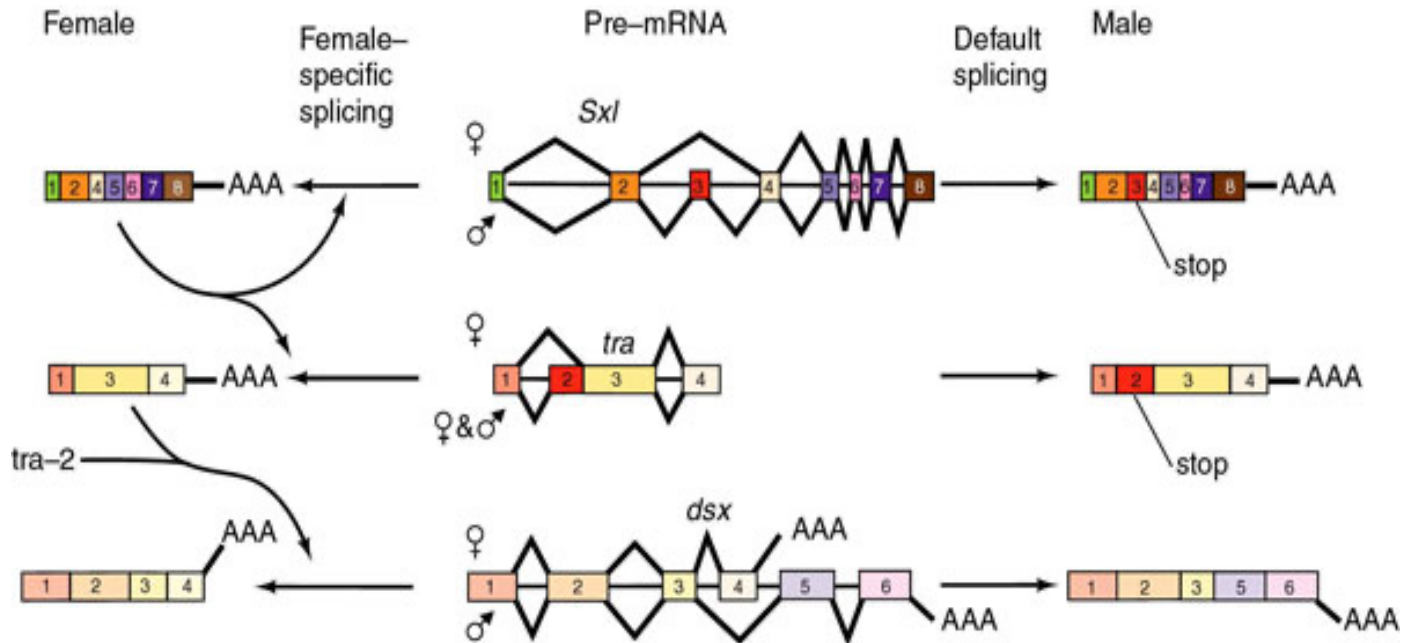


Types d'épissages alternatifs



Determination sexuelle chez la drosophile

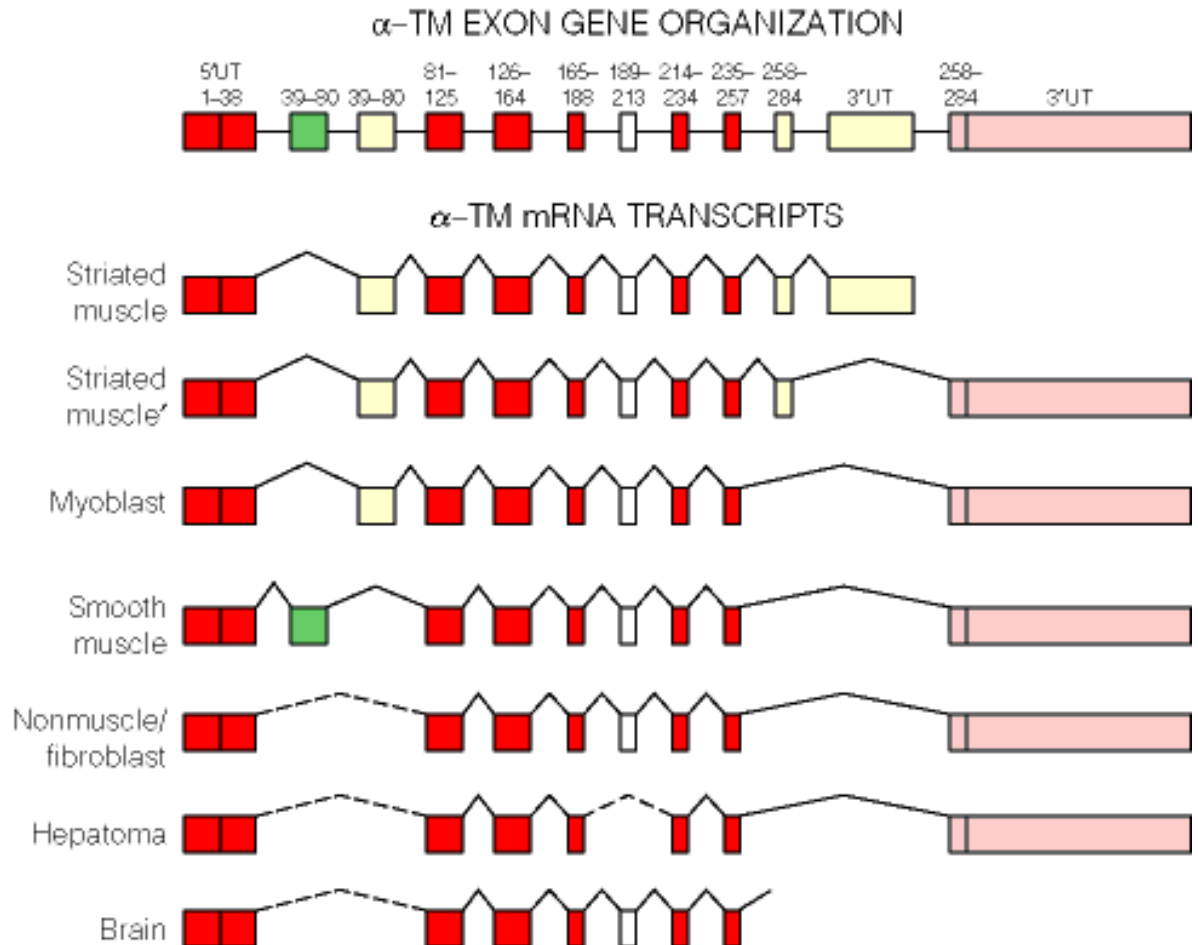
3 gènes de détermination du sexe chez la drosophile, épissés différemment chez les males et les femelles:



Sxl (sex-lethal) est un répresseur d'épissage

Alpha-Tropomyosine (rat): 7 voies d'épissage alternatif

- Rouge = constitutif
- Vert = muscle lisse
- Jaune: muscle strié
- Blanc = tissus variables

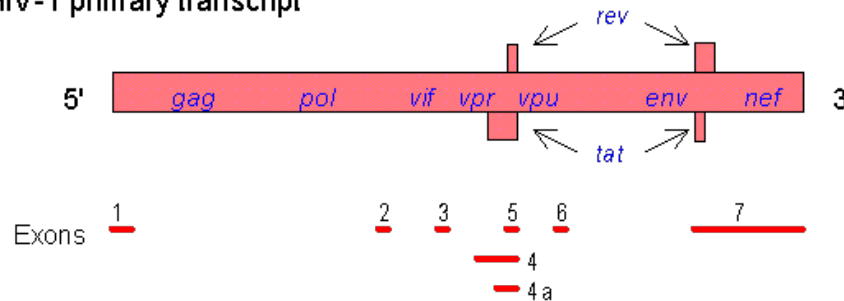


Épissage alternatif de HIV-1

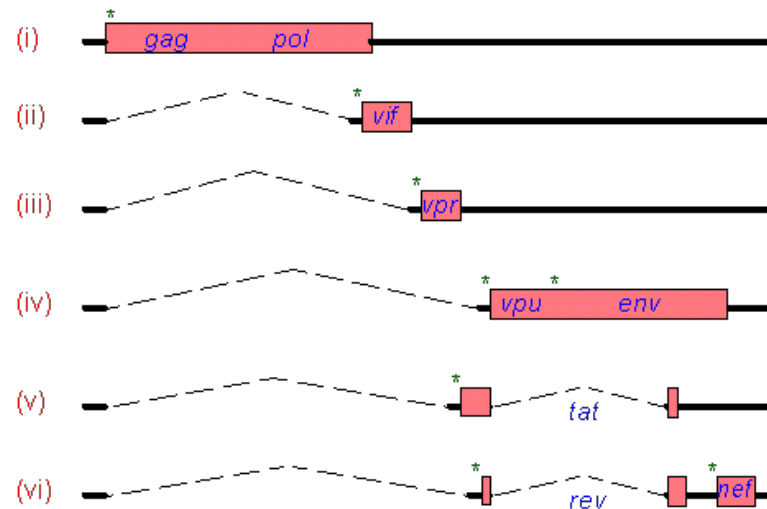
Les 9 protéines de HIV-1 dérivent toutes d'un seul transcrite primaire, via 3 mécanismes:

i) épissage alternatif, (ii) fuites lors du scanning du codon initiateur, (iii) frameshift (décalage de cadre) du ribosome.

HIV-1 primary transcript



Alternative splicing



Epissage alternatif et nombre de gènes

L'épissage alternatif pourrait compenser la relative pauvreté en gène des vertébrés.

3 exemples connus
chez *Saccharomyces cerevisiae*



18000 genes
~10% AS



14000 genes
>35% AS



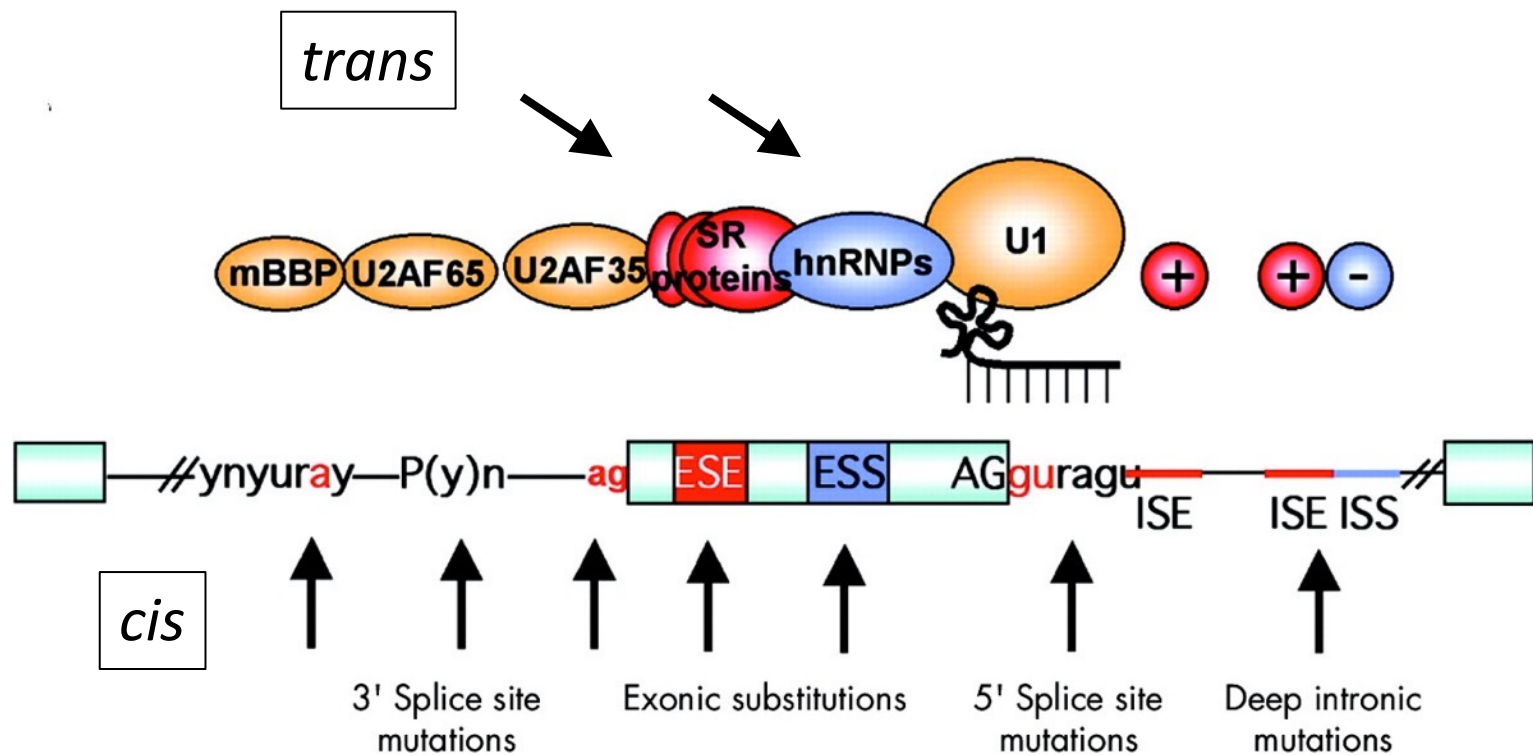
20000 genes
>90% AS

Epissage et maladies

4 classes de défauts d'épissage provoquant des maladies

- Mutation agissant en trans:
 - Perturbant la machinerie basale d'épissage
 - Perturbant la régulation de l'épissage
- Mutation agissant en cis:
 - Perturbant des sites d'épissage
 - Constitutifs
 - Alternatifs

- Grand nombre de mutations pathogènes dans les séquences régulatrices d'épissage et les sites d'épissage eux-mêmes
- Comme les tissus différents utilisent des facteurs d'épissage différents – l'effet de la mutation varie d'un tissu à l'autre

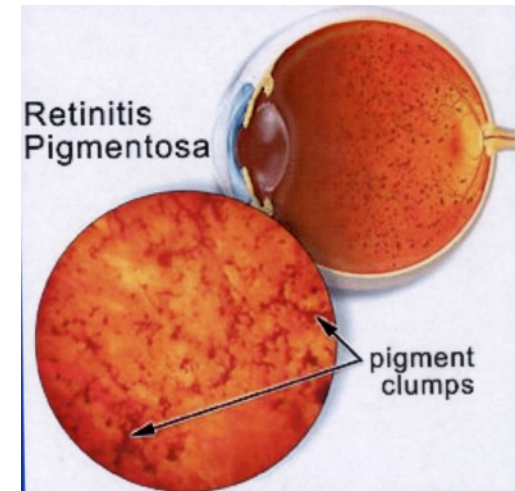


Mutations agissant en trans

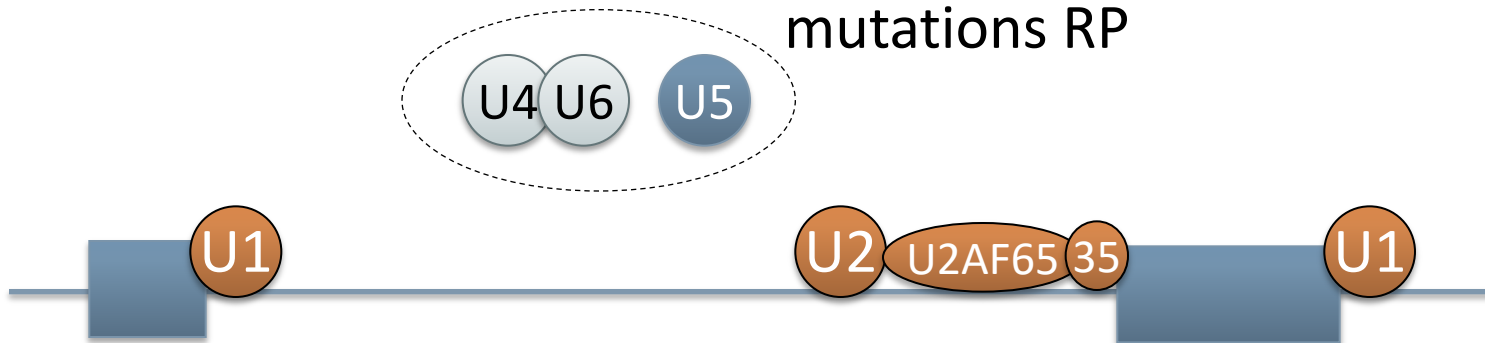
- Rétinite pigmentaire

Rétinite Pigmentaire (RP)

- Groupe de maladies génétiques caractérisées par la perte progressive des photorécepteurs et le dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire, associés à des dépôts pigmentaires visibles au fond d'œil
- 1/4000 naissances



RP: mutations des snRNP

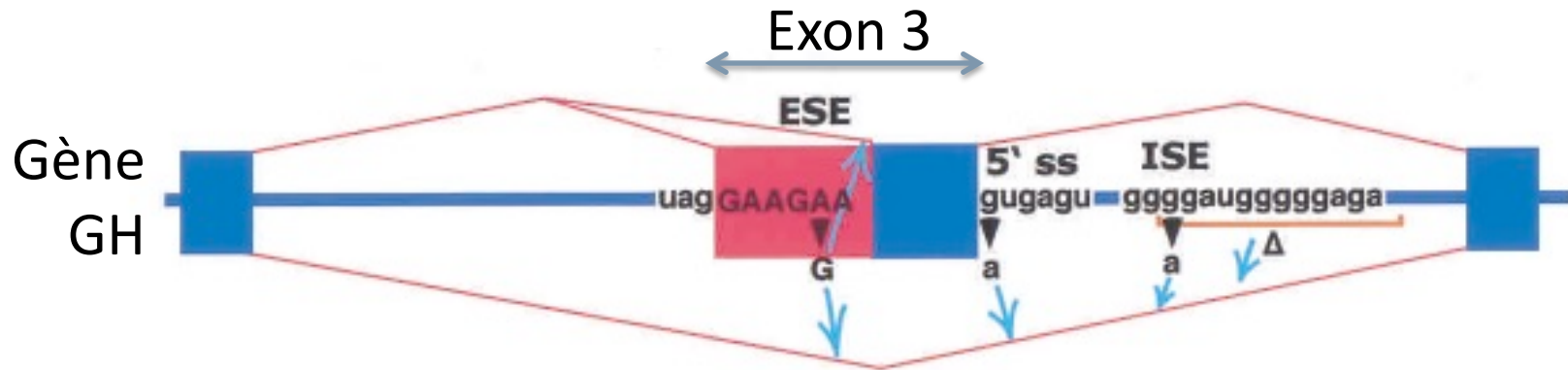


- 3 gènes responsables de la forme dominante autosomale de RP: PRPF31, HPRP3, PRPC8
 - Font partie des snRNP U4/U6/U5
- Très fort effet cellule-spécifique: mal compris
 - (par ex: mutations peuvent agir sur les parties de U4/6/5 interagissant avec les régulateurs d'épissage)

Mutation agissant en cis perturbant des sites d'épissage alternatifs

- Déficit en hormone de croissance type II
- Syndrome de Frasier
- Amyotrophie spinale
- Dystrophie musculaire de Duchenne
- Cancers

Déficit en Hormone de Croissance, type II



- Touche gène d'hormone de croissance -> petite taille
- Protéine normale: 22kd avec 10-16% d'épissage alternatif
 - Site 3' alternatif: retire 45 nt de l'exon 3: protéine 20kd
 - Saut d'exon 3: protéine 17.5kd
- Tous mutants connus augmentent épissage alt. En modifiant un ISE, un ESE, ou le site 5'.

Syndrome de Frasier

(gène WT1: Facteur de transcription)



- Maladie rare du rein et des organes reproductifs
- WT1 produit normalement 2 isoformes au niveau de l'exon 9: KTS+ ou KTS-
- Une mutation de la jonction d'épissage cause une disparition de l'isoforme KTS+
- La mutation est dominante, suggérant que le ratio entre KTS+/KTS- est déterminant.

Amyotrophie spinale

(gène SMN1: survival motor neurone 1)



- Perte de motoneurones – faiblesse/atrophie des muscles, paralysie – mortalité dans l'enfance
- 2 gènes presque identiques: SMN1 et SMN2
 - SMN2 a un ESS -> saut d'exon -> forme non fonctionnelle
 - SMN1 a un ESE -> exon inclus -> forme fonctionnelle
- Les malades ont une mutation C->T dans SMN1 : plus assez de protéine fonctionnelle. Mutation récessive

De nombreux cas d'épissage aberrant dans les cancers

Table 1 Selected examples of cancer-specific alternative splicing categorized by affected tissue

Cancer tissue	Gene	Function	Transacting factor	Selected references
Leukemia	Fyn	Tyrosine kinase	Rex	(73)
Leukemia	Caspase 8	Apoptosis		(90)
Leukemia	PASG	Chromatin modelling		(27)
Thyroid	MUC1	Adhesion, metastasis		(44)
Thyroid, colon	Insulin receptor	Tyrosine kinase		(41 , 42)
Colorectal	Rac1	Signalling GTPase		(29 , 30)
Gastric	KAI1/CD82	Metastasis		(45)
Gastric	WISP1	Invasion		(63)
Pancreas	Secretin receptor	Growth inhibitor		(34)
Pancreas	Gastrin receptor	Proliferation	U2AF	(35)
Liver	DNMT3b4	Chromatin modelling		(26)
Liver	SVH	Novel		(33)
Lung	NRSF	Transcription factor		(22)
Lung	C-CAM	Adhesion		(43)
Lung	VEGF	Angiogenesis		(64)
Lung	Actinin-4	Adhesion, metastasis		(21)
Endometrium	SHBG	Hormone signalling		(24)
Endometrium	Integrin β 1C	Adhesion		(46)
Breast	AIB1	Hormone signalling		(25)
Breast	Androgen receptor	Transcription Factor		(23)
Breast	Estrogen receptor	Transcription Factor		(84)
Breast	Syk	Metastasis		(32)
Breast	uPAR	Adhesion, proteolysis		(62)

Les dystrophies musculaires

1. Dystrophie (ou Myopathie) de Duchenne

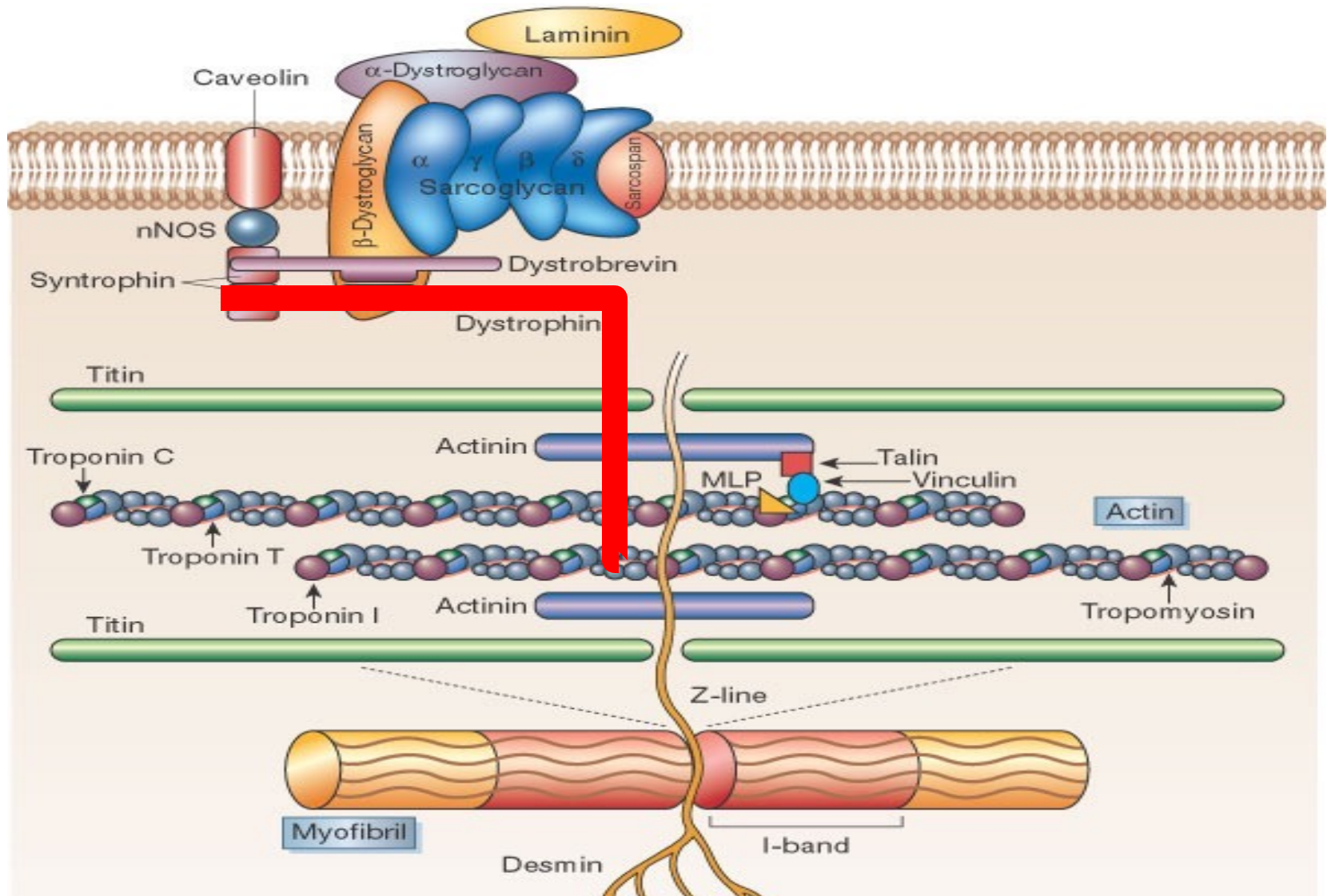
- Gène de dystrophine (DMD)

2. Dystrophie Myotonique

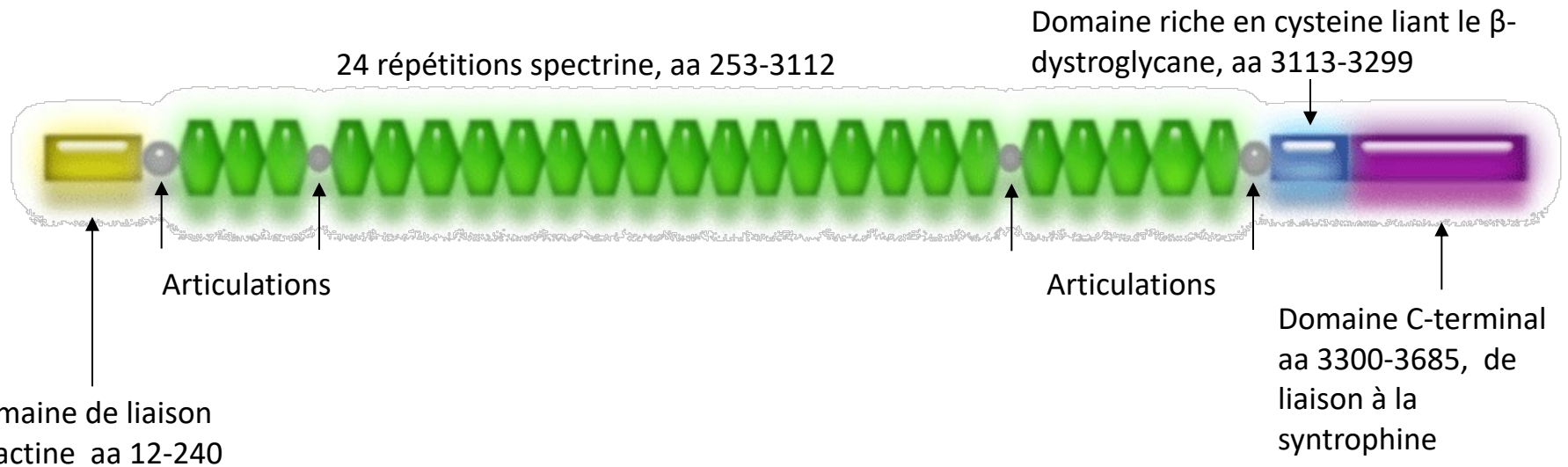
- Gènes DMPK, ZNF9

(expansion de CTG ou CCTG - cf glissement polymérase. Pas lié à l'épissage)

La dystrophine fait partie d'un complexe protéique qui contribue à l'intégrité de la membrane en liant le cytosquelette à la matrice extracellulaire.

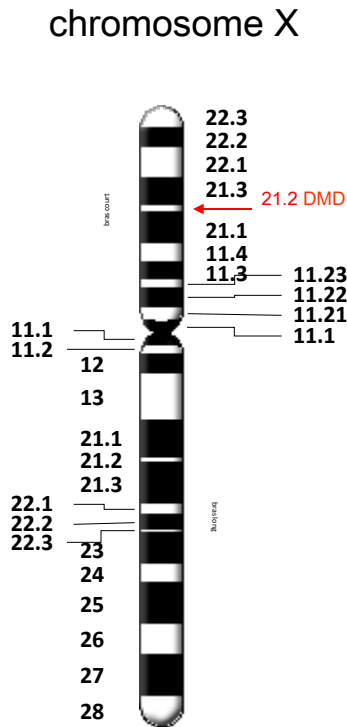


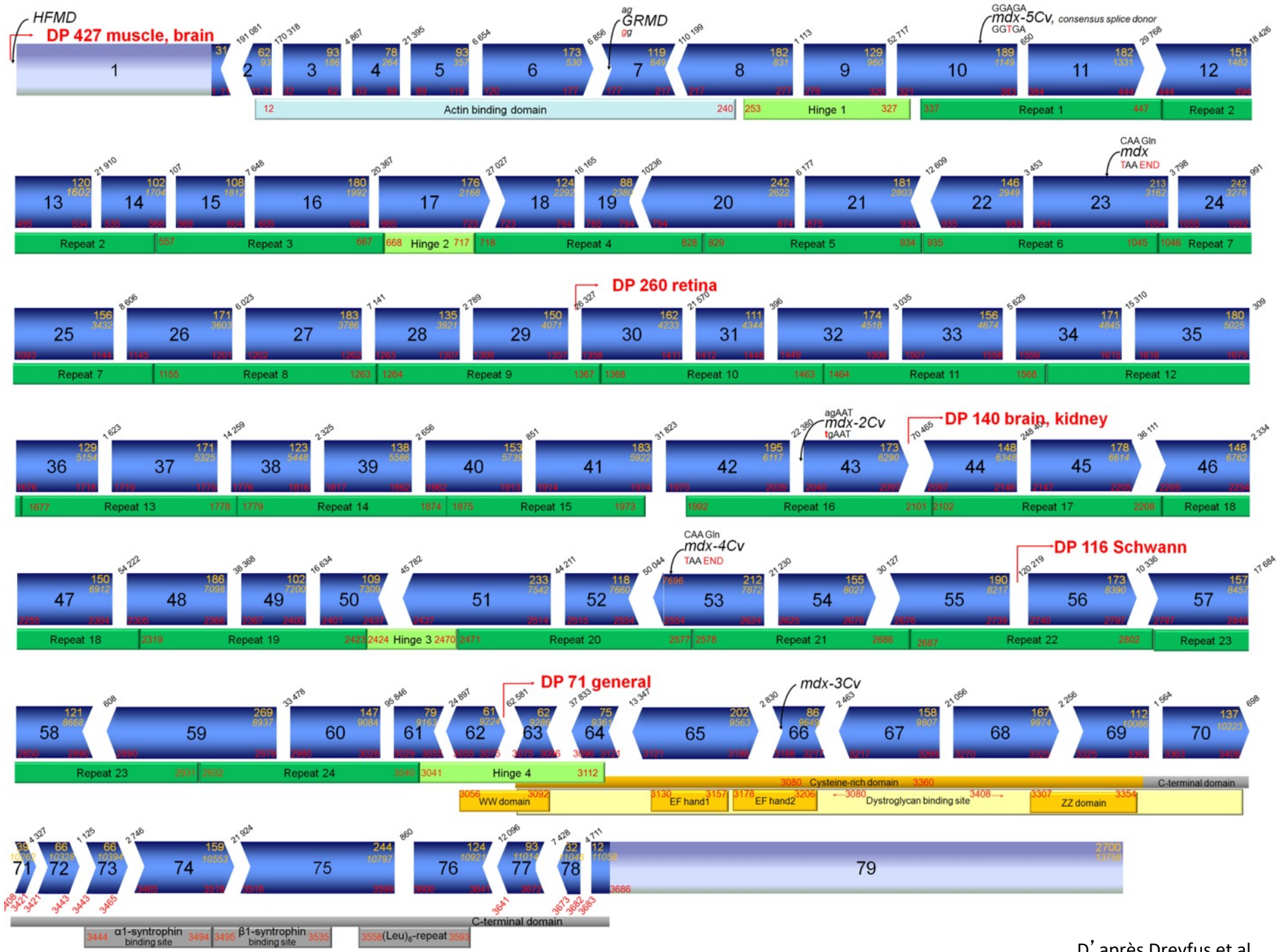
Structure de la dystrophine



Le gène de dystrophine

- 2,5 méga bases
- Exons: 79
- mRNA: 14.040 bp
- Protéine : 3.685 residues
- 6 isoformes : 427 kDa, 260 kDa, 140 kDa, 116 kDa and 71 kDa





Les introns ne sont pas toujours entre deux codons

Coupure entre 2 codons



intron
GACTGTTATnnnnnnnnnn**GAAAGAGAA**

Coupure en position 2 d'un codon



intron
GACTGTTAnnnnnnnnn**TGAAAGAGAA**

Coupure en position 1 d'un codon



intron
GACTGTTATGnnnnnnnnnn**AAAGAGAA**

Toutes sortes de jonctions exon/exon

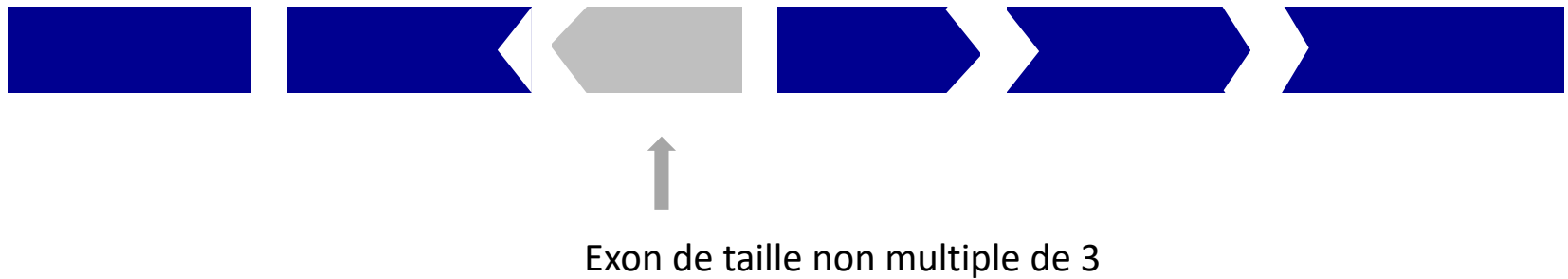


Jonctions dans
un gène de type
sauvage

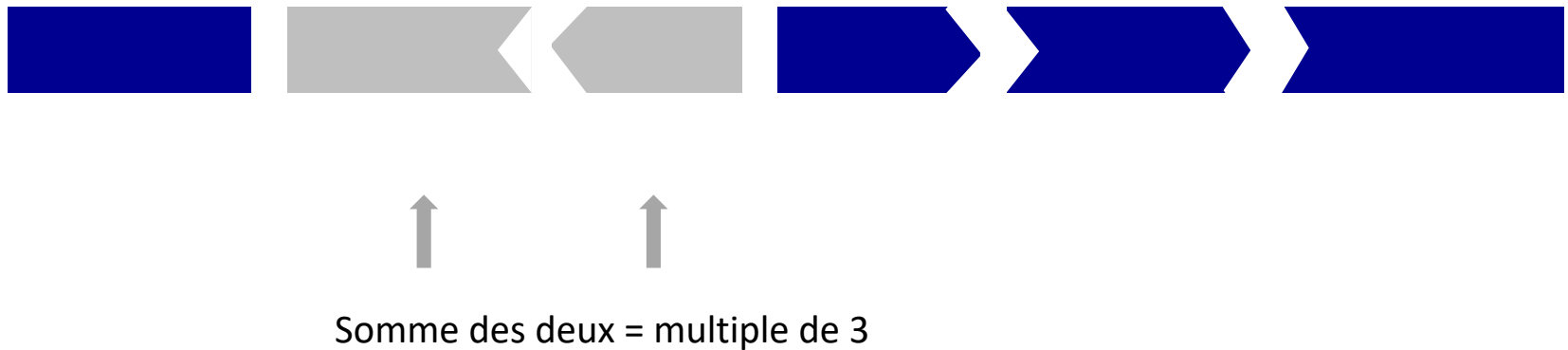
Gène type sauvage



Saut d'exon avec perte de phase



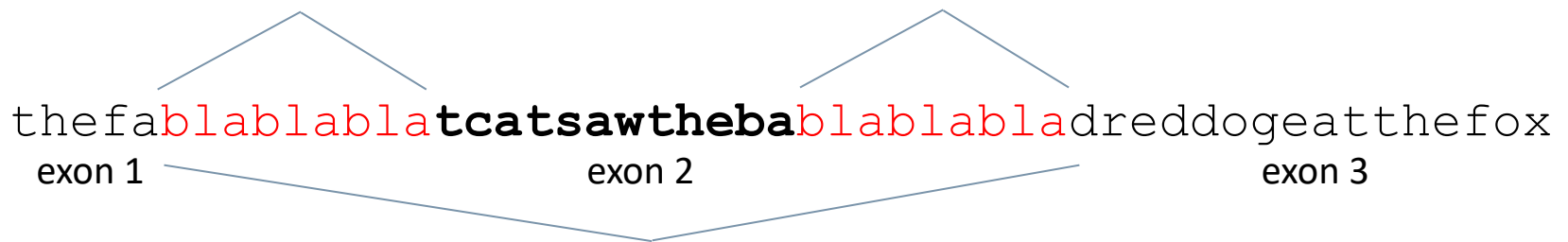
Saut d'exon avec maintien de phase



Illustration

Séquence codante originale

the fat cat saw the bad red dog eat the fox



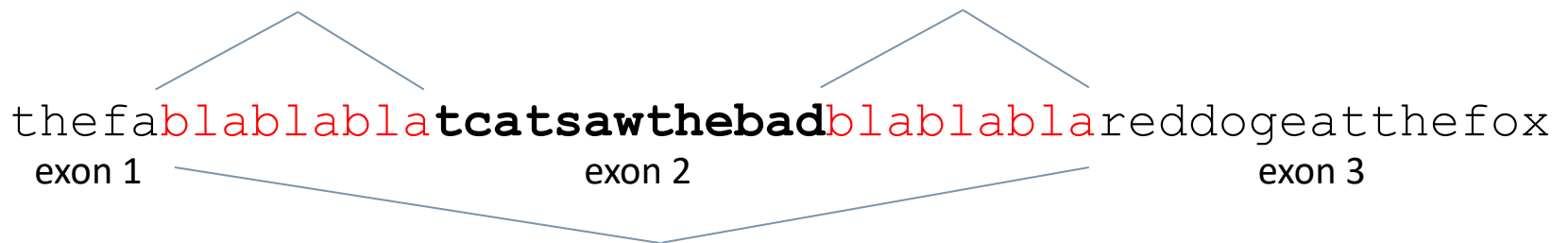
the fad red dog eat the fox

Saut d'exon avec maintien de phase
(cas d'un exon de taille multiple de 3)

Illustration

Séquence codante originale

the fat cat saw the bad red dog eat the fox



the far edd oge att hef ox

Saut d'exon avec perte de phase
(cas d'un exon de taille non multiple de 3)

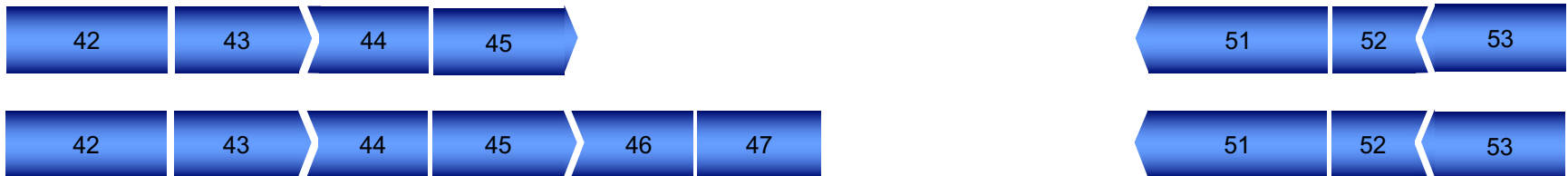
Génotype / phénotype

Attention: origine = délétion dans l'ADN (70%)



Délétion “hors phase” produisant une déficience en dystrophine et une pathologie grave (DMD).

$\Delta 46-50$ ou $48-50$ ($\approx 100-200\text{kb}$) \Rightarrow Duchenne



Délétions “en phase” produisant une pathologie modérée. Dystrophie de Becker (BMD)

$\Delta 45-51$ ($\approx 200\text{kb}$) \Rightarrow Becker



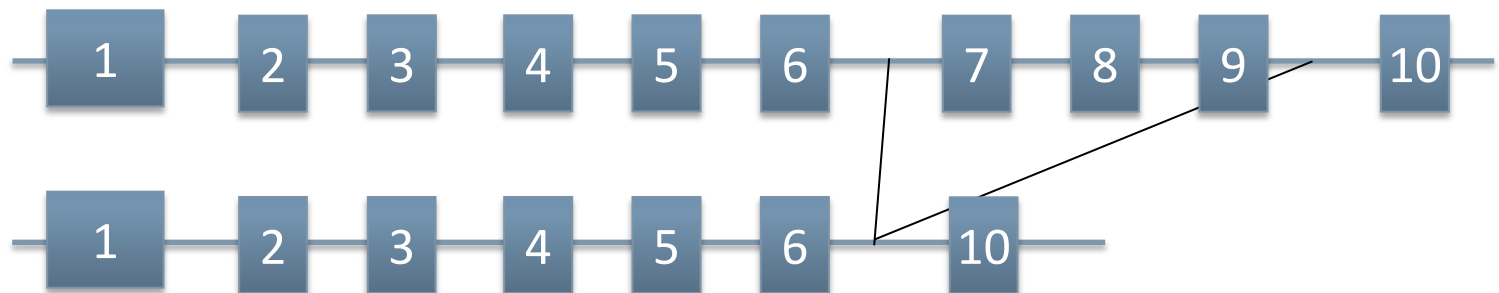
Comment le profil d'épissage est-il modifié dans la DM?

- 70-80% des dystrophies Duchenne ou Becker sont dues à des délétions ou duplications dans l'ADN
- On a donc un défaut génétique qui change la structure exonique
- Ce n'est pas une dérégulation de l'épissage comme dans GH, WT1, SMN1

Autre délétion changeant la structure exonique dans l'ADN

- Délétion héréditaire dans le gène BRCA1

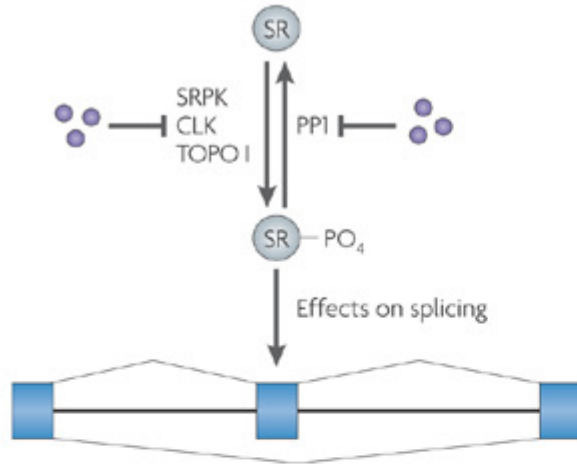
Attention:
ADN!



Thérapies ciblant l'épissage

Thérapies ciblant l'épissage

a Small molecules

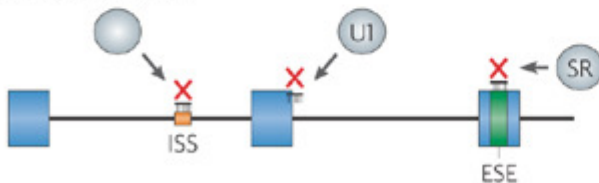


c Oligonucleotide (gain of function)

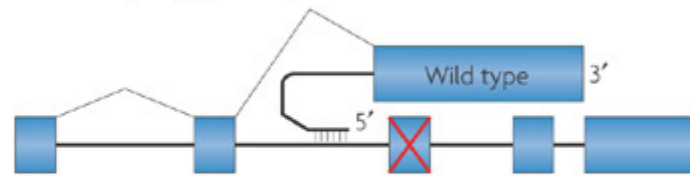


b Oligonucleotide (loss of function)

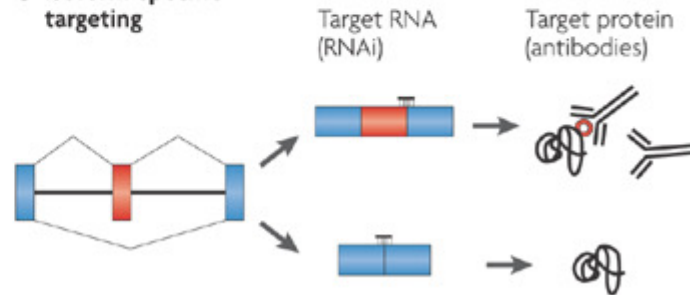
Repressor or activator



d Trans-splicing (SMaRT)



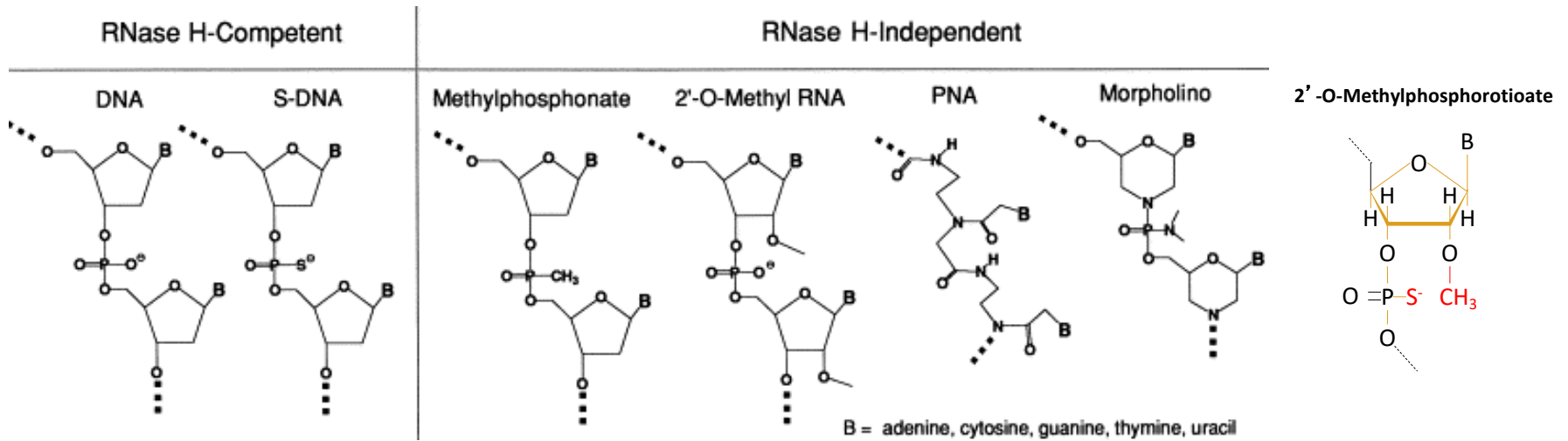
e Isoform-specific targeting



SR Splicing Regulator

Nature Reviews | Genetics

ASO: AntiSense Oligonucleotides - Types de nucléotides modifiés utilisés:



Déclenchent
dégradation du
duplex par
RNase-H

Restent fixés sans dégradation
par RNase-H
->Blocage traduction ou
interférence avec maturation
ARNm dans le noyau

ASO: Avantages et Inconvénients

- Avantages
 - Ça marche
 - Administration systémique possible
 - Ne causent pas de réponse immunitaire
- Inconvénients
 - Effet temporaire (besoin d'injections répétées)
 - Ne rentrent pas dans le cœur
 - Toxicité inconnue à la dose efficace

-> Utilisation de vecteur Adénovirus pour exprimer l'antisens de manière stable dans le noyau

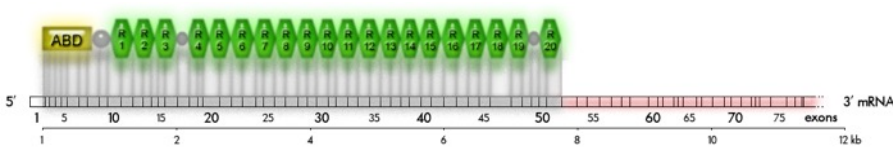
Retour à la dystrophine: provoquer artificiellement le saut d'exon pour restaurer la phase

Exemple : pour "soigner" $\Delta 48-50$: faire sauter l'exon 51 pour restaurer la phase.



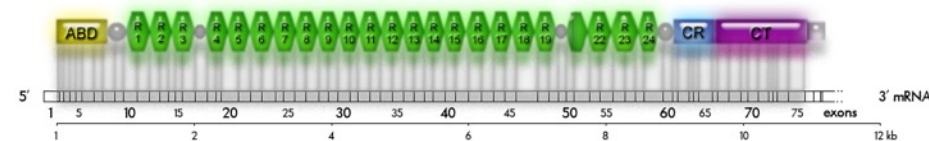
D'après Dreyfus et al.

Dystrophine tronquée instable



DMD

Dystrophine tronquée stable et fonctionnelle



BMD

Le saut d'exon thérapeutique



- Intervention sur le processus d'épissage pour empêcher l'incorporation de l'exon ou des exons choisis.
- Ces sauts d'exon peuvent être induits par des ASO complémentaires de séquences-clés qui président à l'épissage du transcrit primaire

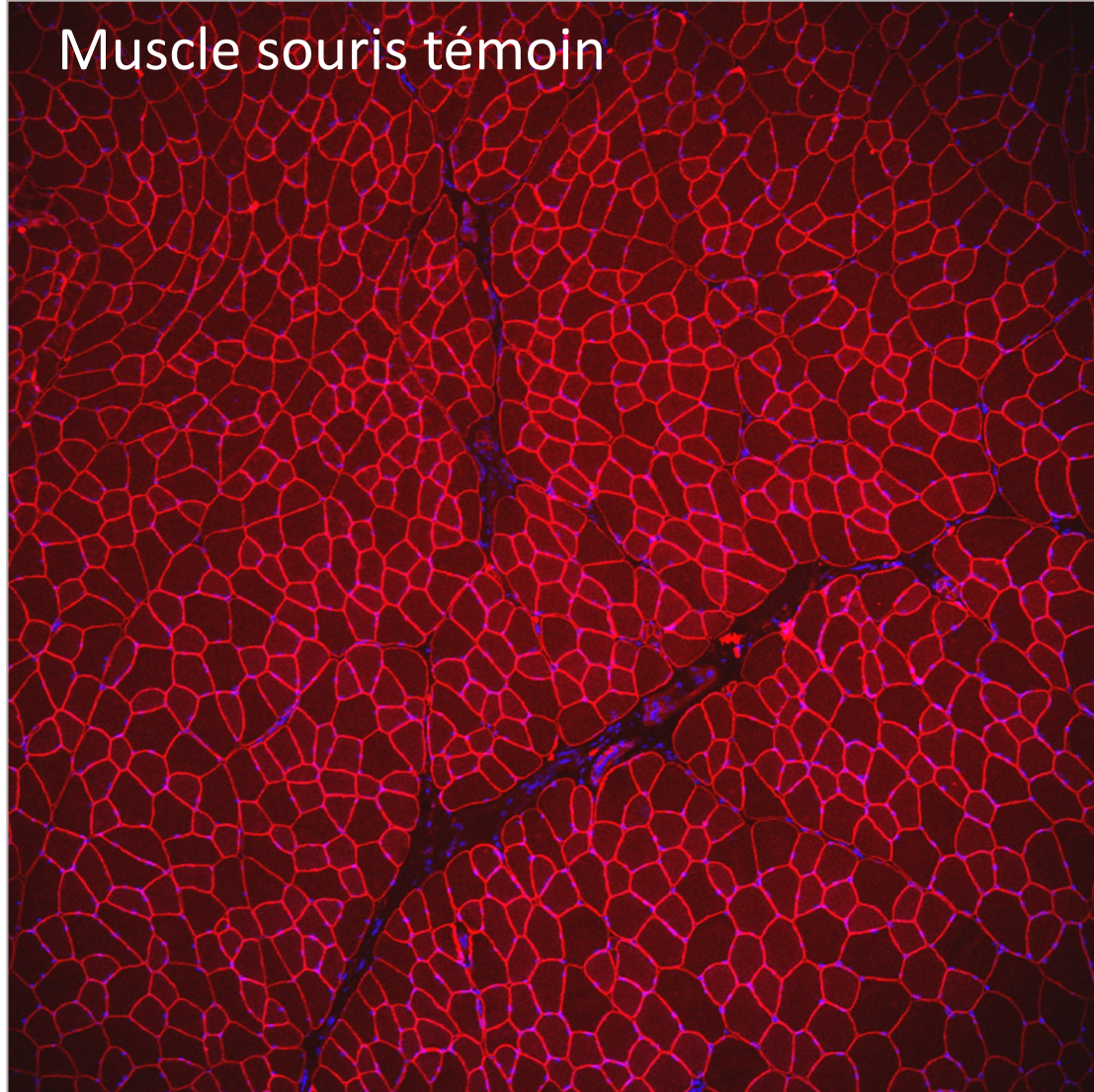
(Multiples travaux depuis 2001)

Exemple de résultats

- Saut d'exon 23 par antisens chez la souris
- Utilisation d'un adénovirus (AAV) capable d'entrer dans le noyau et d'exprimer l'antisens de façon stable (plusieurs années)

Résultats obtenus sur saut d'exon 23 par antisens sur vecteur AAV

Muscle souris témoin

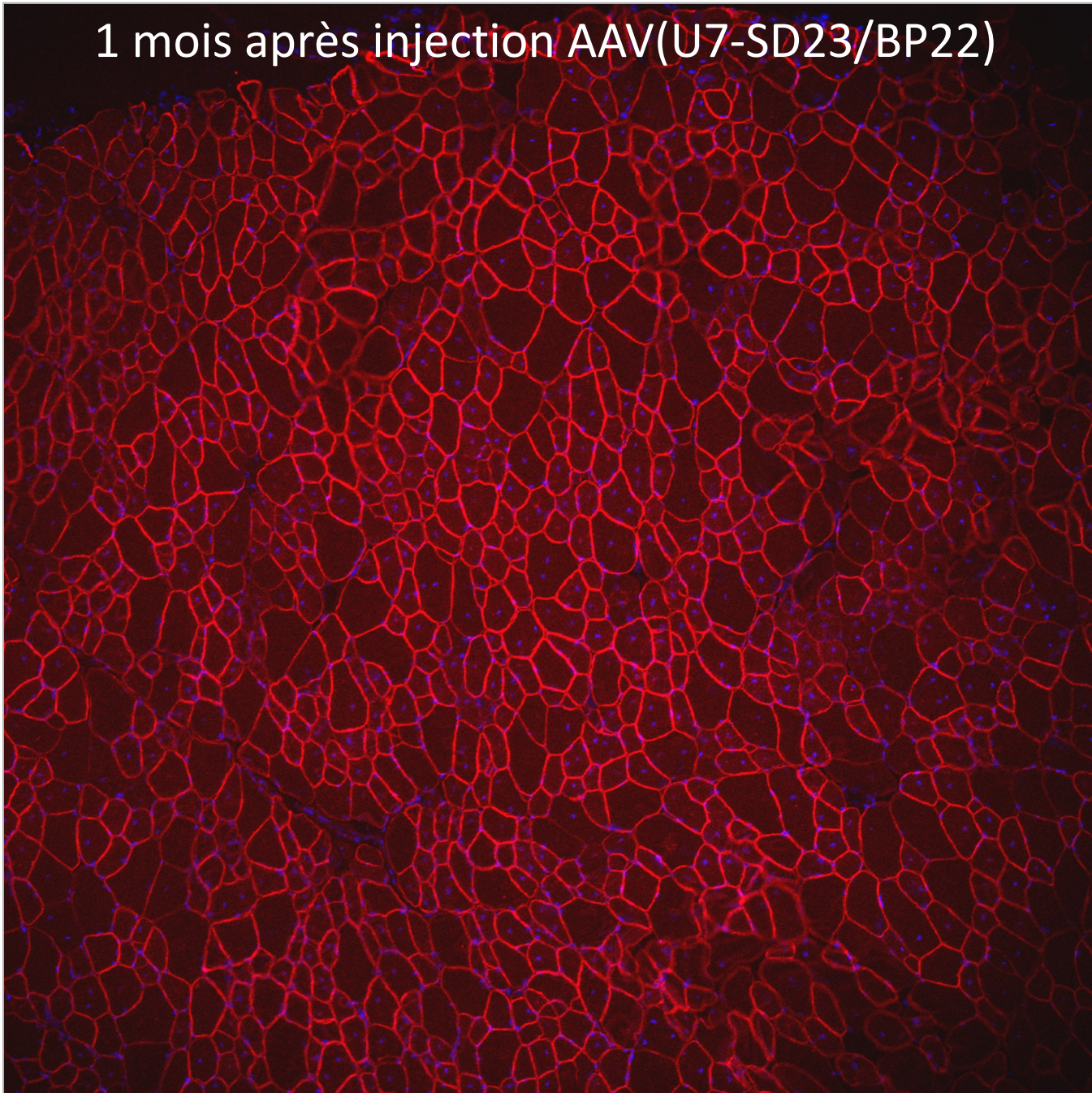


Immunomarquage
dystrophine. Ici
bien localisée
proche des
membranes

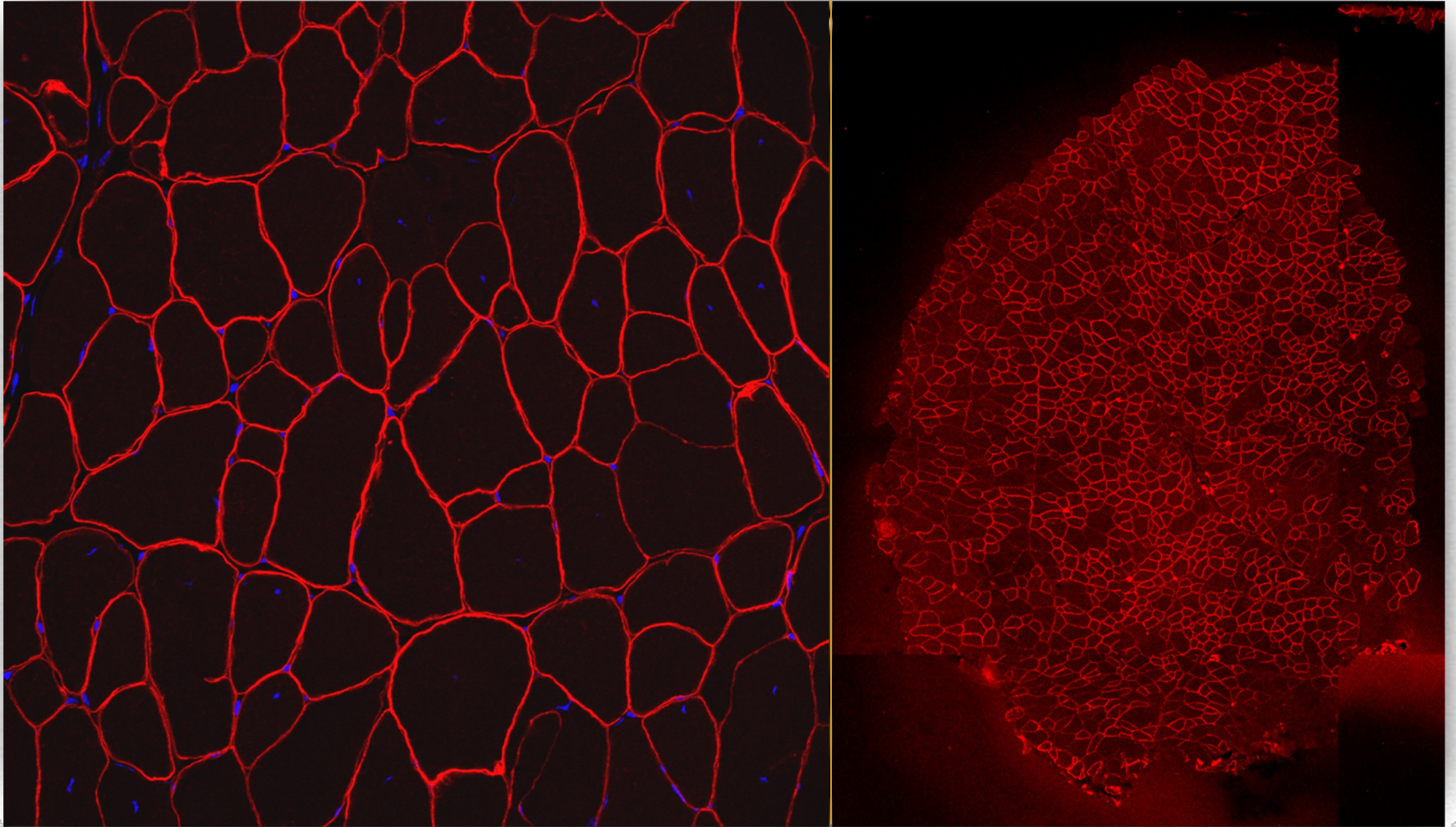
Muscle souris mdx non-traitée



1 mois après injection AAV(U7-SD23/BP22)



Un an après injection unique



Thérapies permettant d'exprimer un ARNm normal

- Amyotrophie spinale: thérapie par adenovirus portant le gène SMN1 normal.
- 1 injection suffit



Santé

À quel prix le Zolgensma[®], le médicament le plus cher du monde, sera-t-il vendu en France?

Jean-Yves Nau — 1 juillet 2019 à 7h30

Esperance majeure contre une maladie neuromusculaire d'origine
génétique, le traitement vient d'être commercialisé aux États-Unis à
un prix invraisemblable.

Slate, 2019

Un traitement à 2M \$?

Rappel avant de passer à la traduction

