

Applications du génie génétique

1. Diagnostic de maladies génétiques

RFLP(Restriction Fragments Length
Polymorphism)

Drépanocytose

Mutation :

- Désigne n'importe quel changement intervenu dans la séquence de l'ADN sans préjuger de sa pathogénicité à l'échelle du gène ou du chromosome

On parle aussi de « VARIANTS »

- Moteur de l'évolution
- Source de la diversité entre individus
- Origine des maladies génétiques monogéniques et des prédispositions (maladies polyfactorielles)

■ Dépend de l'effet fonctionnel de la mutation:

- neutre
- « amélioration d'une fonction »: diversité, évolution
- « altération d'une fonction »: effet pathogène

Drépanocytose

Falciformation

- Modification de forme :
 - Biconcave > falciforme (faucille) = « drépanocyte »
 - Forme rigide et fragile
 - Destruction dans la circulation (durée de vie : 20j vs 120j)
 - Mauvaise circulation dans les vaisseaux + adhérence à l'endothélium



Locus

Emplacement sur un chromosome (d'un gène, d'une séquence,...)

Allèle

Une ou plusieurs **versions alternatives** d'un même gène, d'une même séquence d'ADN. Ss'applique aux mutations, aux polymorphismes, aux marqueurs génétiques,...

Exemples :

Pour un gène : allèle sauvage et allèles mutés

Pour un marqueur : différentes tailles (allèle de 8 répétitions, allèle de 10 répétitions, etc.)

Hétérozygote

Un individu est hétérozygote pour un locus lorsqu'il possède **deux allèles différents** à ce locus

Homozygote

Un individu est homozygote pour un locus lorsqu'il possède **deux allèles identiques** à ce locus

Hémizyote

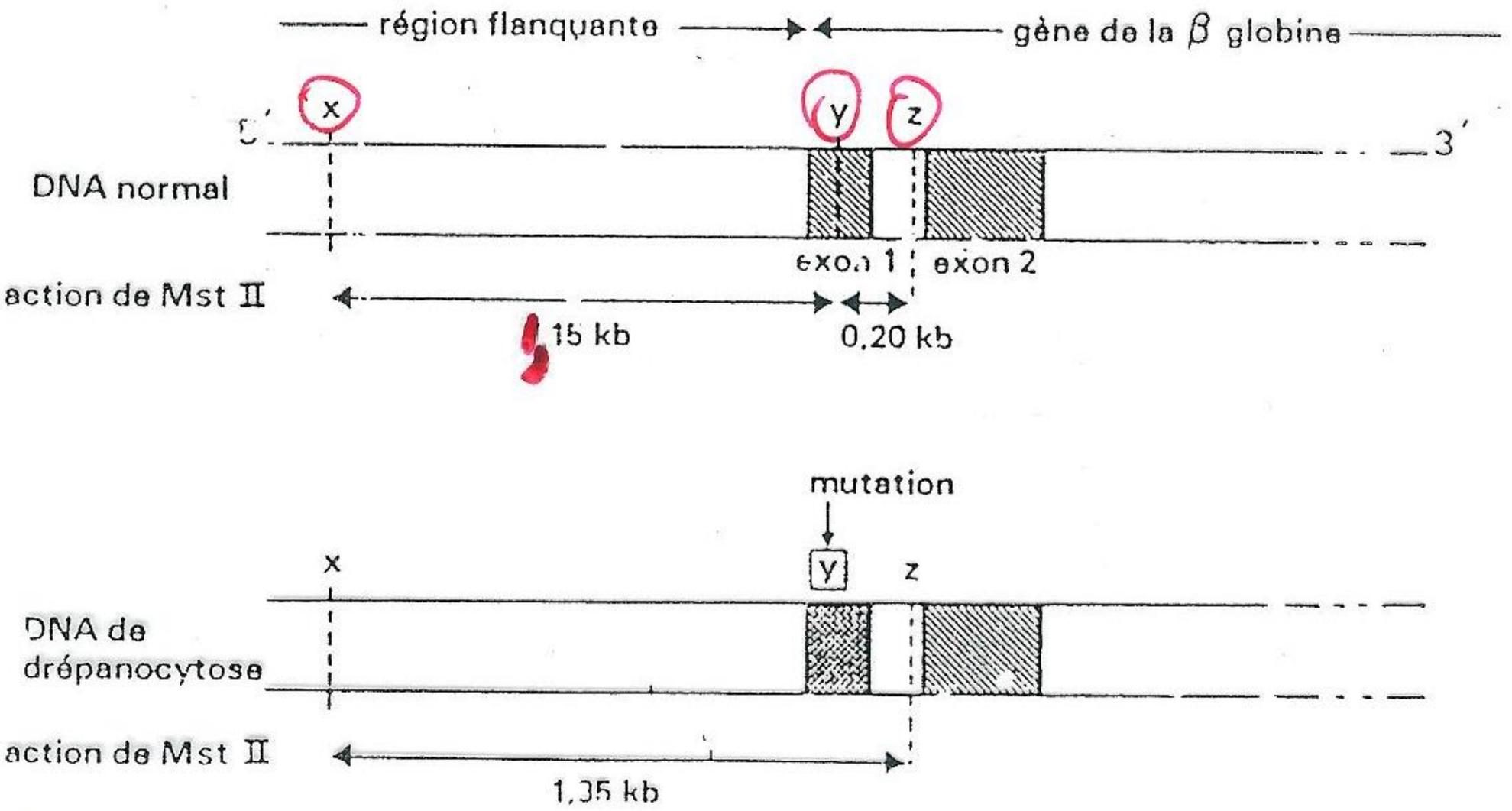
Un individu est hémizyote pour un locus lorsqu'il possède **un seul allèle** à ce locus (cas du chromosome X chez l'homme)

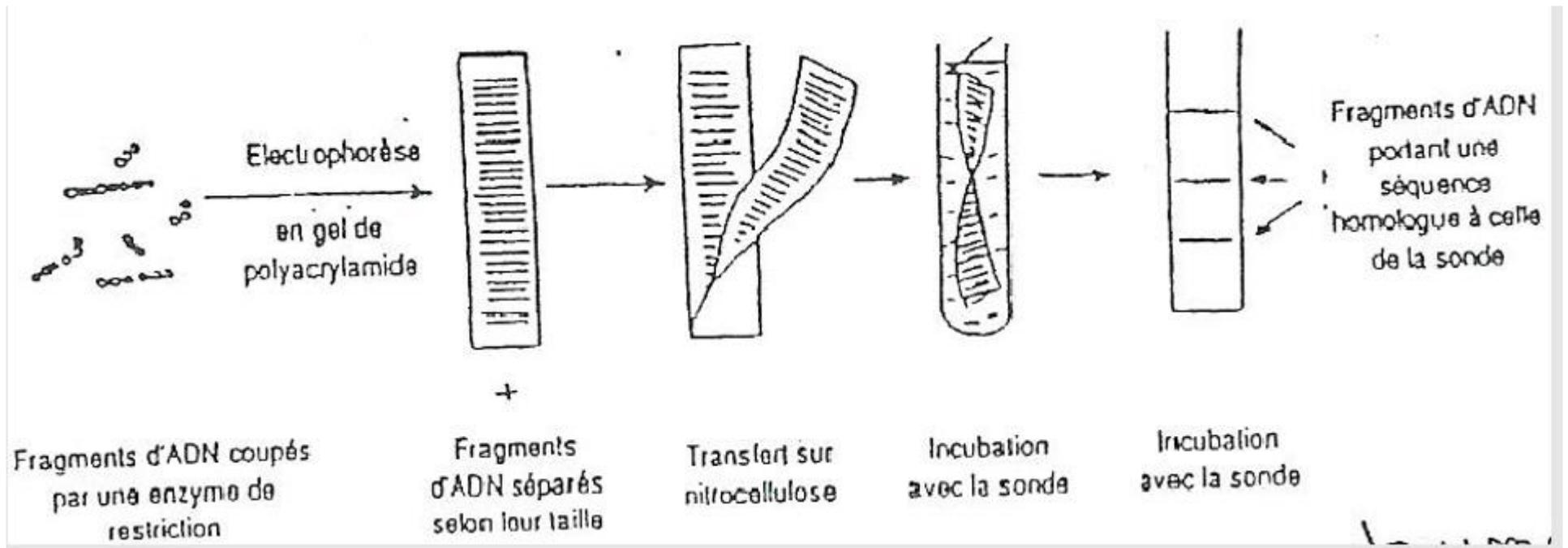
Trophoblaste

Drépanocytose

ITG

BET Bromure d'éthidium



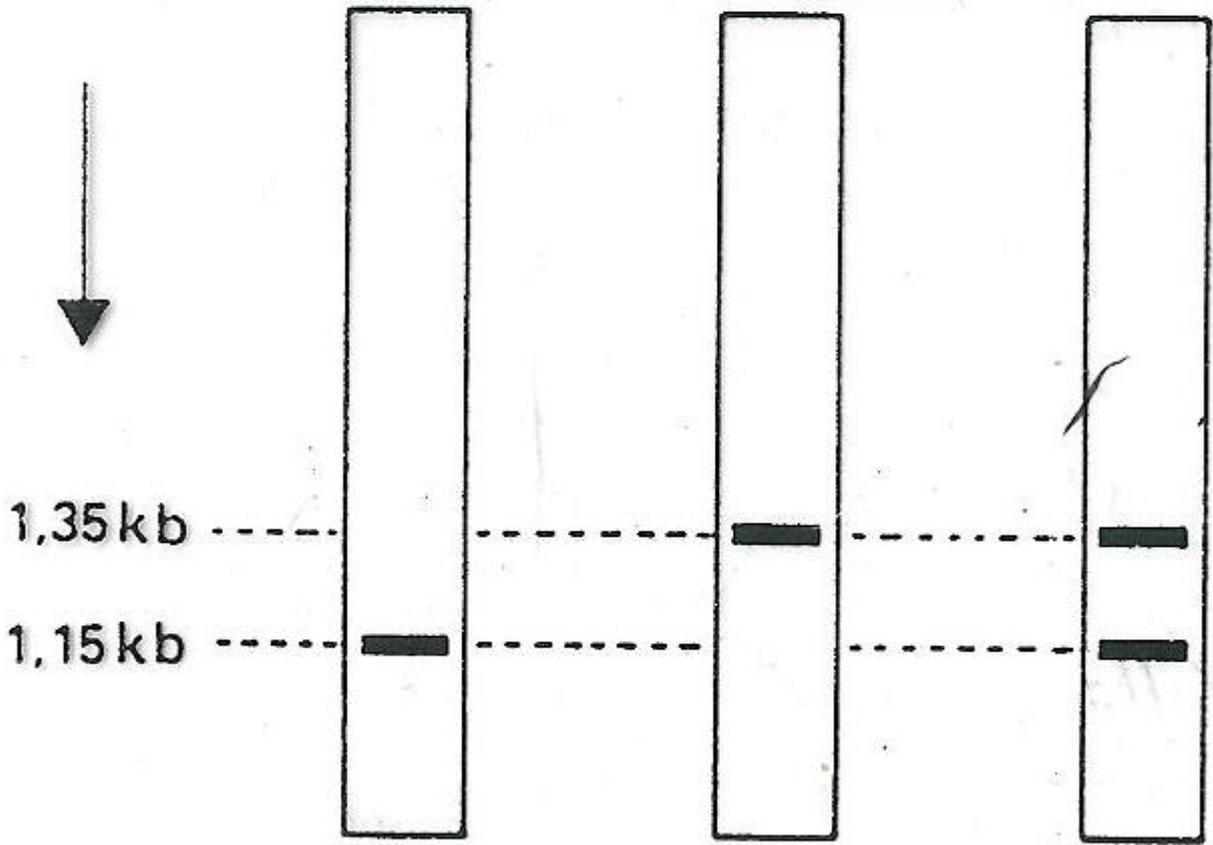


Normal

Drépanocytose

homozygote

hétérozygote



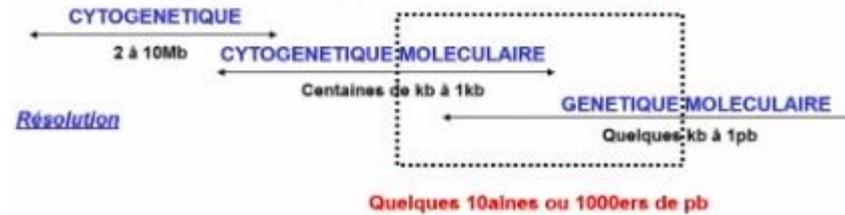
Techniques d'étude d'anomalies du Génome entre Microlésions et Macrolésions

MACROLESIONS

MICROLESIONS

Echelle du Chromosome

Echelle du Gène



- Southern Blot
- CGH array



Rappel: Polymerase Chain Reaction « PCR »

Une anomalie génétique
...que l'on cherche à identifier

Problème:
Études au niveau moléculaire
=> faibles quantités de matériel

Solutions:
=> Travail sur de grandes quantités de prélèvement
=> **Amplification de la région d'intérêt**

ADN du patient en faible quantité



Polymorphismes du génome

- Un polymorphisme est une mutation
et peut se situer en région codante ou non codante
- La notion de « polymorphisme » repose à la fois sur:
 - le caractère non pathogène de la variation
 - la fréquence dans la population (>1% par définition)

Maladies monogéniques

Maladies polyfactorielles

2 Empreintes génétiques

2.1 Intérêt

2.2 Définitions : SSR (Simple Sequence Repeat)

Minisatellites ou VNTR (Variable number tandem repeat)

6 à plusieurs centaines de nucléotides

Microsatellites ou STR (Short Tandem Repeat)

1 à 4 nucléotides, ex:CAGT

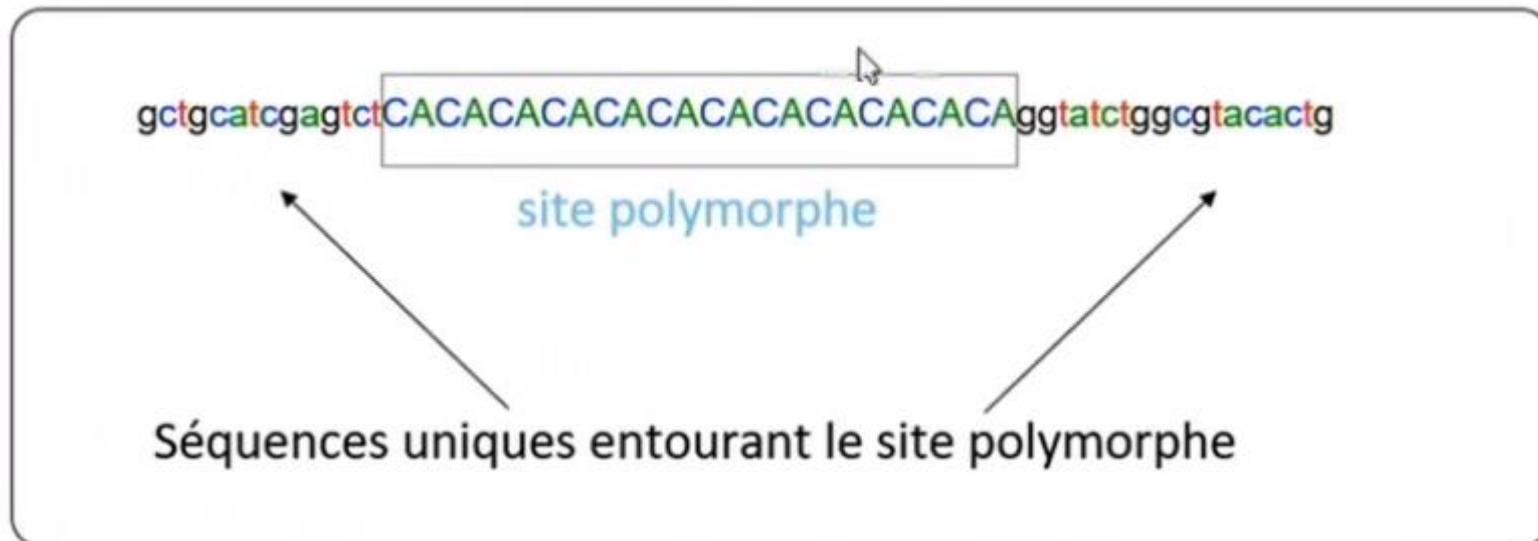
2.3 techniques

-Sondes uniloculaires

Les marqueurs microsatellites

séquences d'ADN répétées en tandem d'un motif de 2 à 10 pb et dont la taille totale est inférieure à 100 pb.

Ils sont très polymorphes et répartis uniformément sur l'ensemble du génome principalement dans les séquences intergéniques et intragéniques (rarement dans les séquences codantes) et constituent d'excellents marqueurs génétiques.



Séparation des allèles en fonction de leur taille

gctgcatcgagtcCACACACACACACACACACACAggtatctggcgtacactg

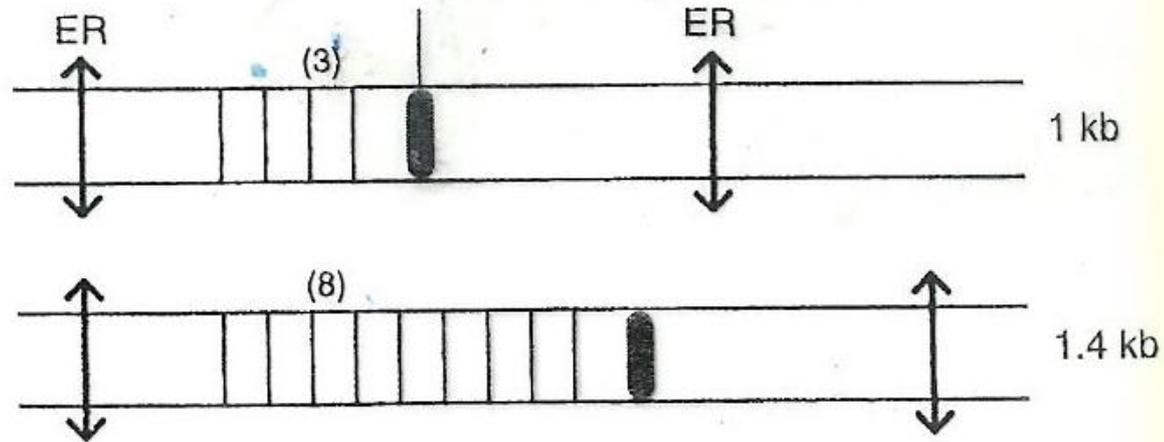
allèle "12 répétitions"

gctgcatcgagtcCACACACACACACACACACACACACACAggtatctggcgtacactg

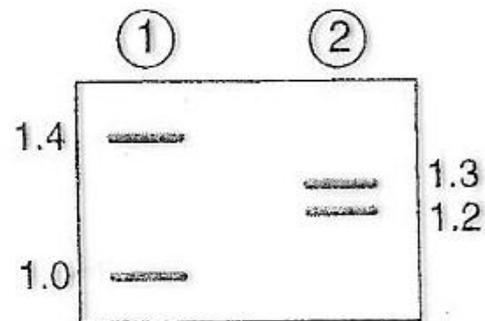
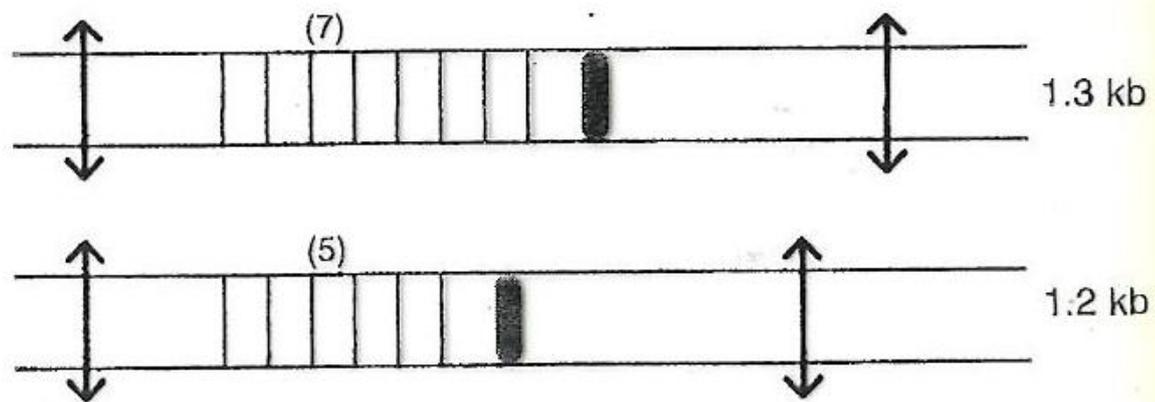
allèle "15 répétitions"

Séquence unique de locus reconnue par une sonde uniloculaire

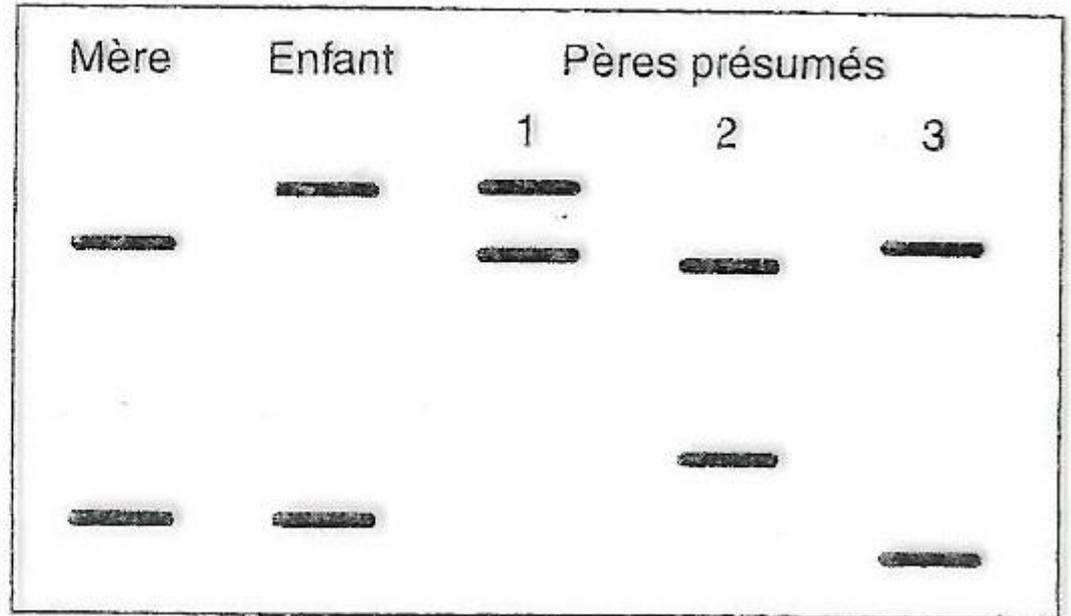
①



②

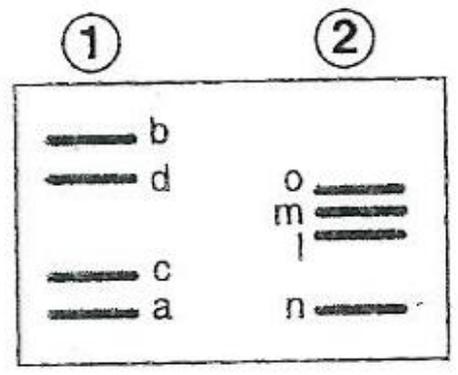
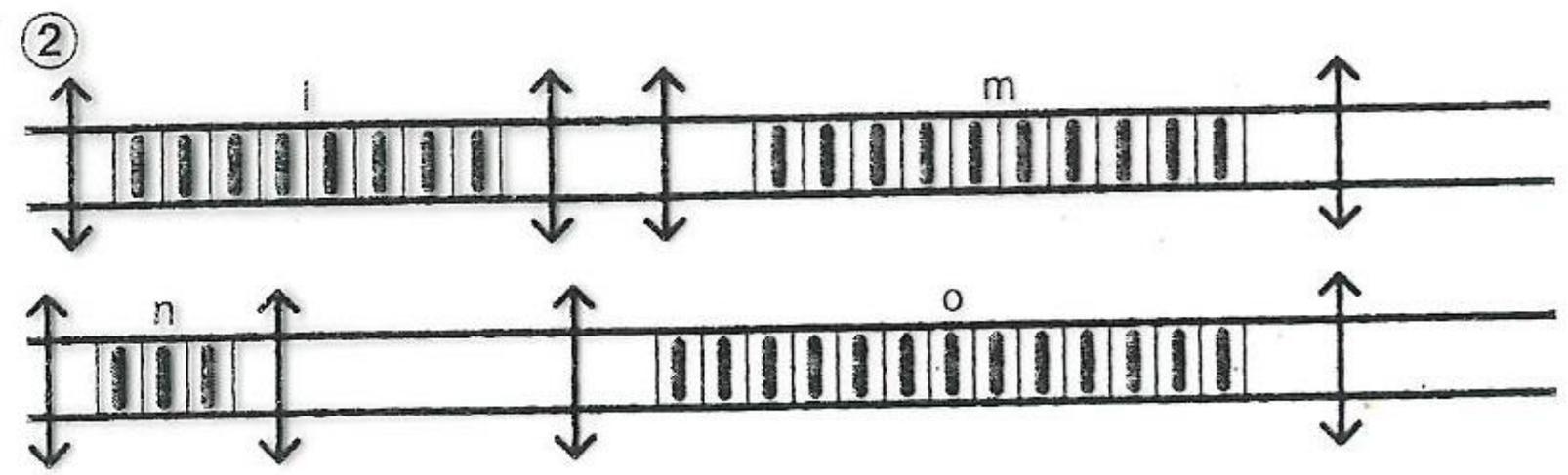
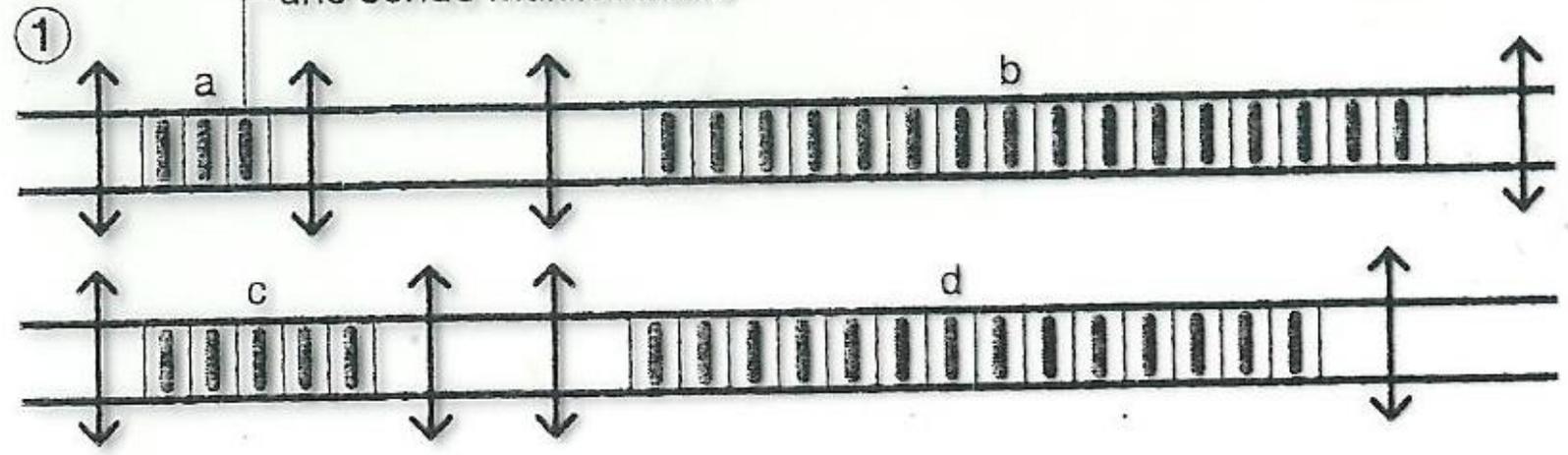


4
Empreintes génétiques (RFLP) avec une sonde uniloculaire, dans le cas d'une recherche de paternité (schéma).



- Sonde multiloculaire

Séquence reconnue par
une sonde multiloculaire



Empreintes génétiques (RFLP) avec une sonde multiloculaire, dans le cas d'une recherche de paternité. Le père présumé 2 peut être exclu. Pour simplifier, seul le schéma d'un segment du film a été représenté. L'examen de la concordance des bandes porte évidemment sur un plus grand segment, ce qui permet de conclure que le père 1 est le père biologique (schéma).

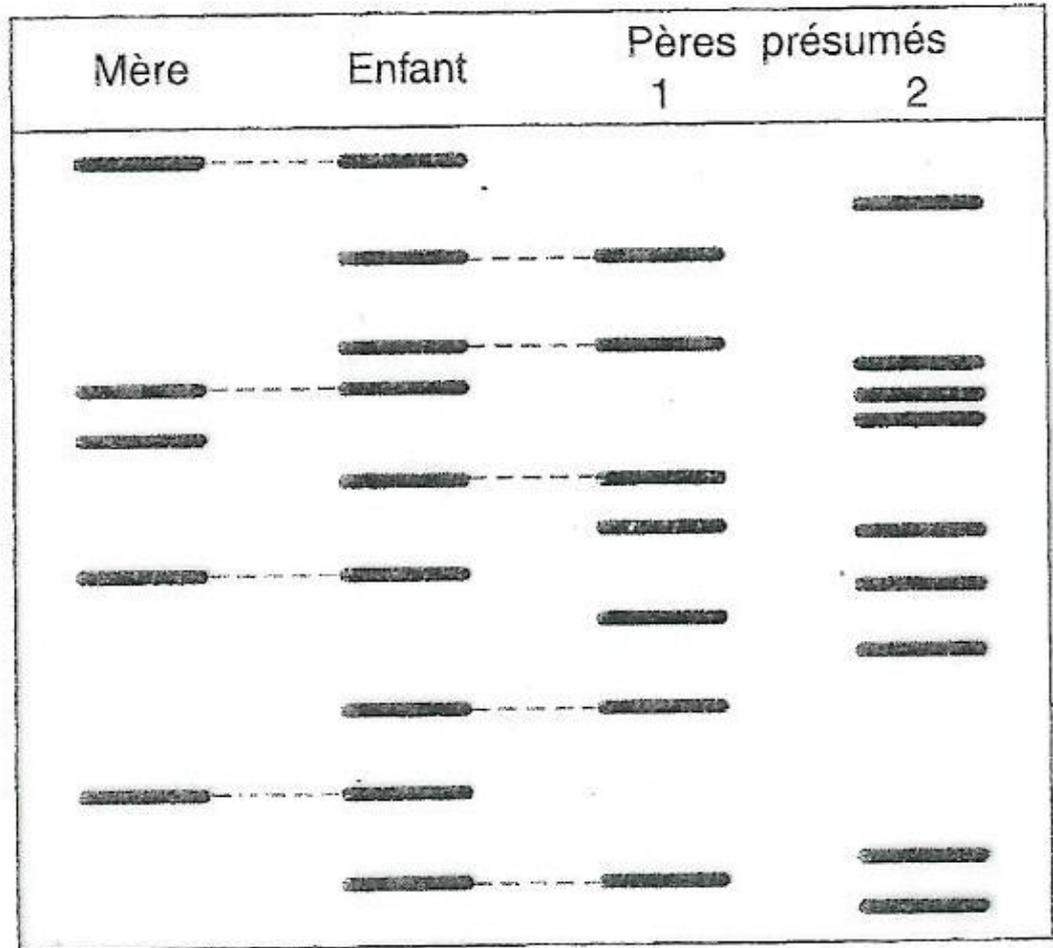


Tableau 4.3
Quelques séquences répétées simples
du génome humain

Motif répété de la SSR	Nombre de SSR dans le génome humain
5'-AC-3'	80,330
5'-AT-3'	56,260
5'-AG-3'	23,780
5'-GC-3'	290
5'-AAT-3'	11,890
5'-AAC-3'	7,540
5'-AGG-3'	4,350
5'-AAG-3'	4,060
5'-ATG-3'	2,030
5'-CGG-3'	1,740
5'-ACC-3'	1,160
5'-AGC-3'	870
5'-ACT-3'	580

Données tirées de Lander et al. 2001. *Nature* 409: 889.

Chromophore	Nom du locus	Chromosome	Motifs répétés	Taille moyenne de l'amplicon
Indigo	D8S1179	8	TAGA	147
Indigo	D21S11	21	TCTA/TCTG	212
Indigo	D7S820	7	GATA	240
Indigo	CSFIPO	5	TAGA	325
Vert	D3S1358	3	TAGA	131
Vert	TH01	11	TCAT	178
Vert	DI3S317	13	TATC	231
Vert	DI6S539	16	GATA	287
Vert	D2S1338	2		324
Bleu	DI9S433	19		117
Bleu	VWA	12	TCTG/TCTA	155
Bleu	TPOX	2	GAAT	230
Bleu	DI8S51	18	AGAA	280
Rouge	Amelogénine	X et Y		107/113
Rouge	D5S818	5	AGAT	143
Rouge	FGA	4	CTTT	341



Rappel: Polymerase Chain Reaction « PCR »

Une anomalie génétique
...que l'on cherche à identifier

Problème:
Études au niveau moléculaire
=> faibles quantités de matériel

Solutions:
=> Travail sur de grandes quantités de prélèvement
=> **Amplification de la région d'intérêt**

ADN du patient en faible quantité



- Par PCR

PCR multiplex

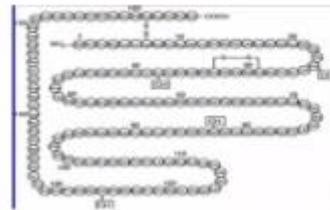
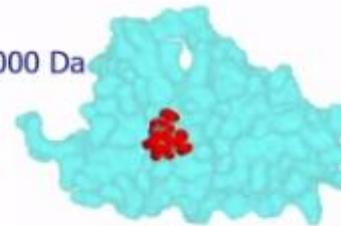
3 Industrie pharmaceutique: quelques exemples de biomédicaments

Creuzefeld –jacob

Antithrombine humaine III

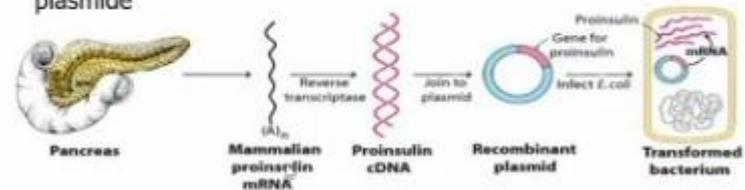
Bio-médicament Vs petites molécules

- Différence de taille
 - Aspirine : MW 180 Da
 - Erythropoïétine : MW 30 000 Da
- Complexité structurale
 - Structure primaire EPO

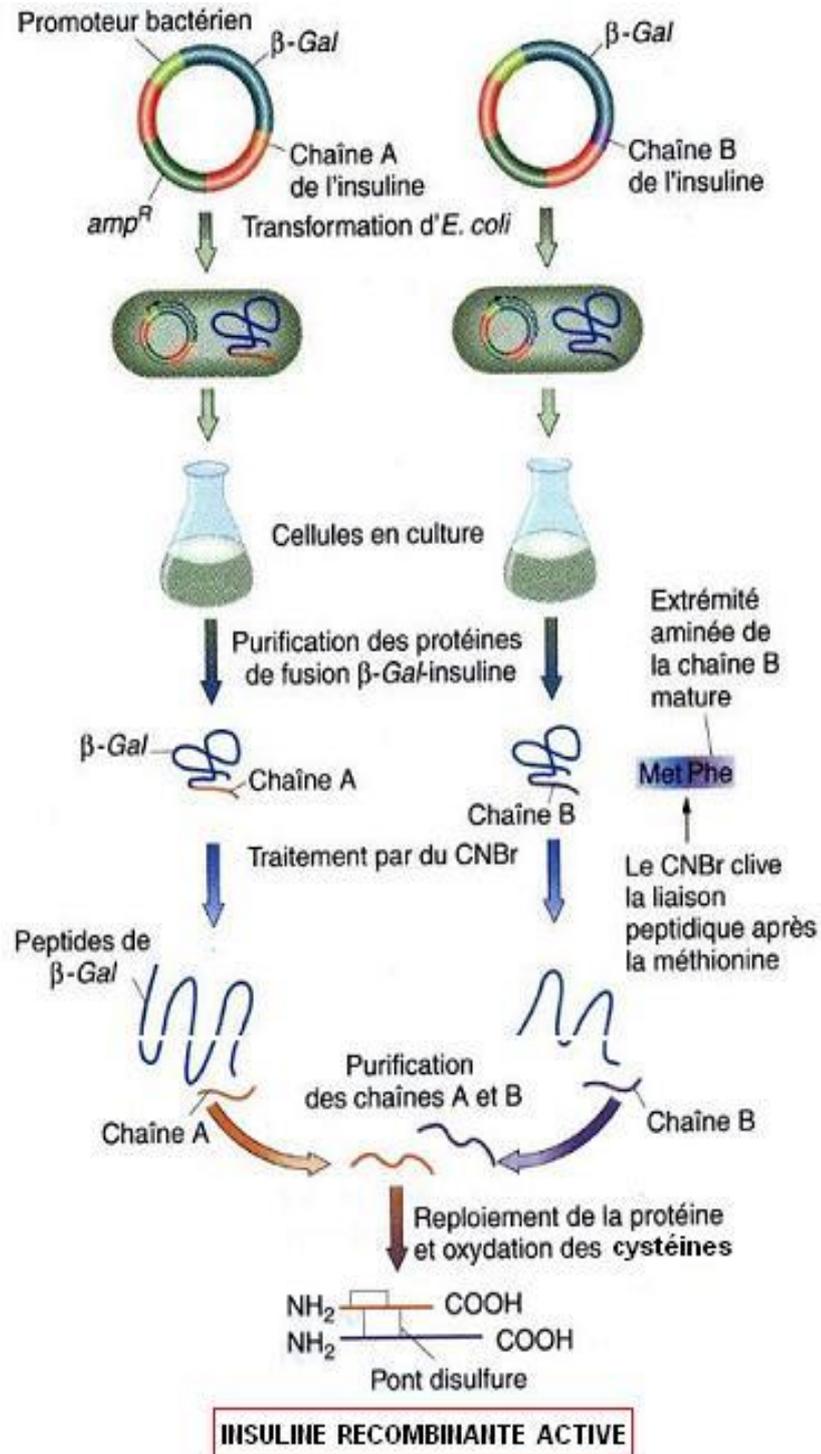


Première insuline recombinante humaine

- Isolement du gène de la pro-insuline à partir d'une banque de gènes issue de pancréas humain et clonage (insertion) dans un plasmide



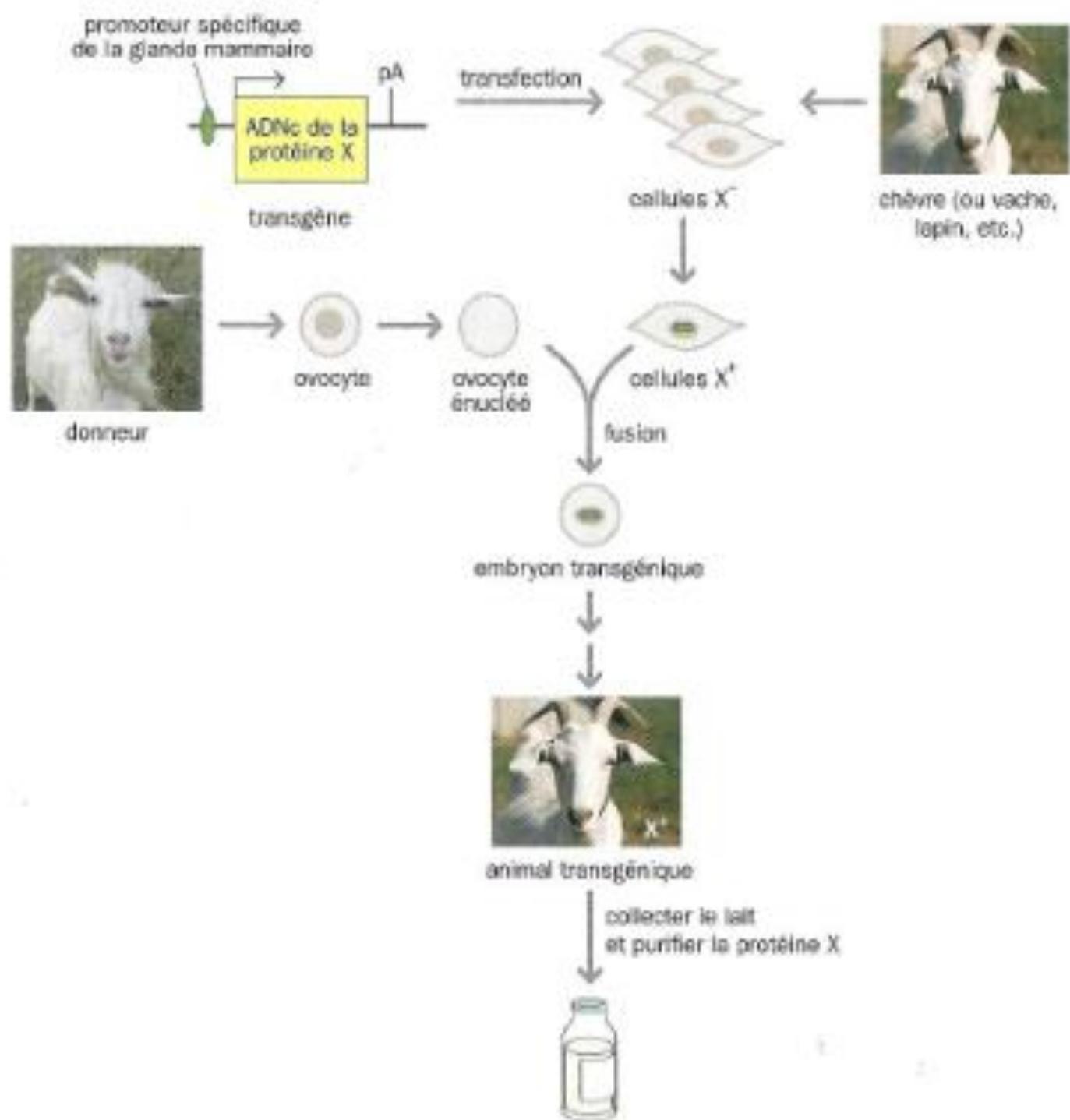
- Transfert du plasmide recombinant et expression dans E. coli
 - Synthèse de pro insuline sous la forme de corps d'inclusion dans la bactérie (difficile à dissoudre)
- Isolement de la pro insuline et transformation en insuline active à partir de ces corps d'inclusion
 - Processus long et onéreux



Humulin (Eli Lilly, 1983) – première insuline humaine produite par l'industrie

- Ajout d'un peptide signal de 24AA à l'extrémité 5'
- Permet la sécrétion d'insuline **dans le milieu de culture** à la place de sa rétention dans les corps d'inclusion
- **La chaîne A est synthétisée dans une culture d'E. Coli**
- La chaîne B synthétisée dans une culture différente d'E. Coli
- Les 2 chaînes sont purifiées séparément puis reliées entre elles



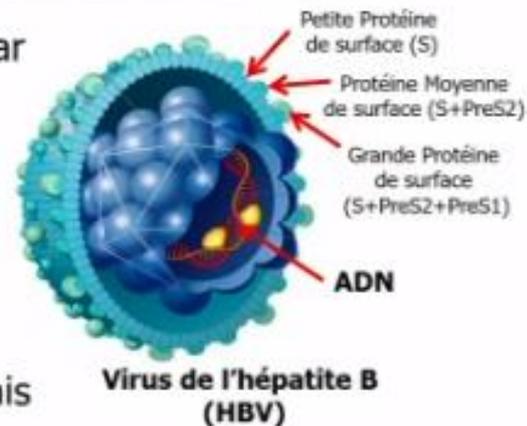


4. Diagnostic bactériologique

4.1 sondes nucléiques(accuprobe)

Vaccin contre Virus de l'hépatite B (VHB)

- Hépatite B causée par le virus VHB
- 350 millions de porteurs
 - 2 millions de morts par an
- Vaccin contre fragments de VHB mis au point
 - Contre AgHBs (protéines de surface très immunogènes)



4.2 PCR

Rappels:

Limites : inhibiteurs

Contamination

Les secteurs préPCR, postPCR

Témoin - et +

Hot start PCR,

What is Hot Start PCR?video

PCR spécifique en point final

pathovars

trachomatis

→ électrophorèse ex:les

→ sondes ex:Chlamydia

Risques de contamination :

✓ technique de la « marche en avant »

Zone « propre »	Préparation des tubes de PCR, préparation des mix PCR
Zone de pré amplification	Extraction d'ADN Addition de l'ADN et témoin dans tubes de PCR
Zone post-amplification	Amplification PCR Séparation et visualisation des produits de PCR

-PCR en temps réel:qPCR

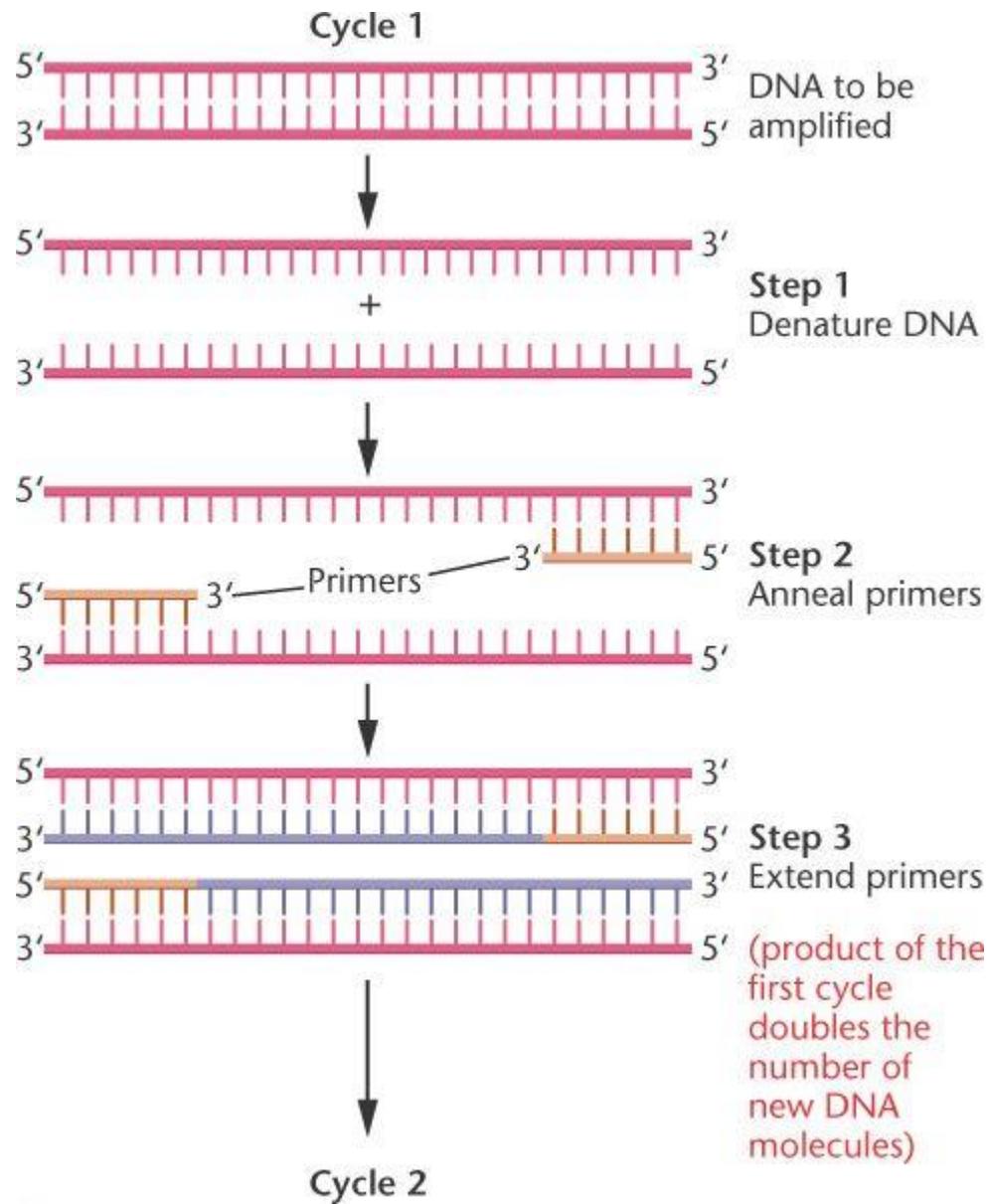
RTPCR

Ex :Gene mecA des SAMR

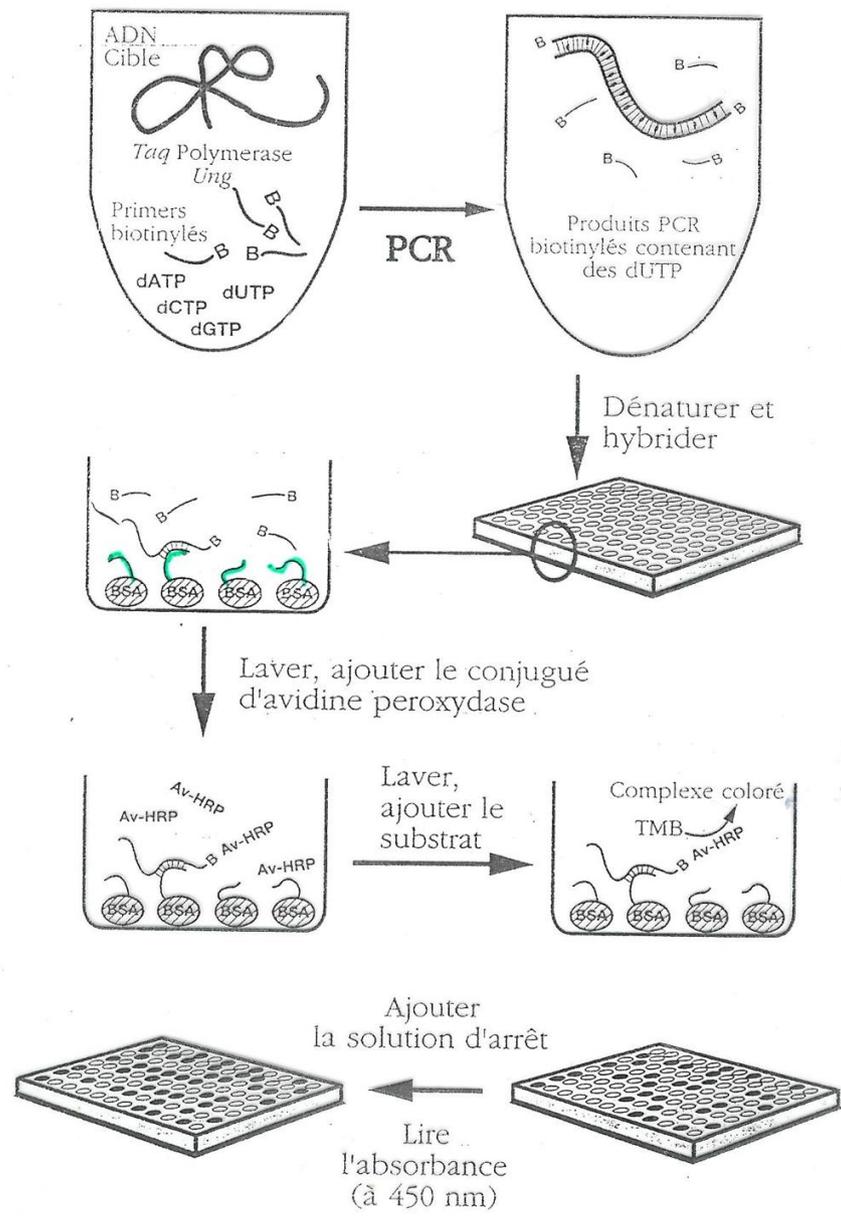
-PCR universelle : ADNr16S

1500pb

Gene rpoB



<i>Nom</i>	<i>Acronymes français (anglais)</i>	<i>Cibles</i>	<i>Séquences des amorces</i>	<i>Taille du produit</i>	<i>Référence</i>
<i>E. coli</i> entéro-pathogène	ECEP (EPEC)	eae	TTA ACG GCT ATT TCC GCA TGA G	249	CNR
(et <i>E. coli</i> entéro-hémorragique)			TCG TCA CCA GAG GAA TCG GAG T		
<i>E. coli</i> entéro-hémorragique	ECEH (EHEC, STEC)	<i>stx1</i>	GGA AGA GTC CGT GGG ATT AC GAA AGC GAT GCA GCT ATT AAT AAT G	135	CNR
		<i>stx2</i>	CAA CGG TTT CCA TGA CAA CG GTG ACA GTG ACA AAA CGCA G	184	



4.3 Génomotypage ou typage moléculaire

RFLP, MVLA (Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis), puce à ADN

5 Thérapie génique

Définition

Thérapie germinale, somatique

Thérapie ex vivo, in vivo

Thérapie Génique

- **DEFINITION**

Modification du matériel génétique de cellules vivantes,
par transfert d'acides nucléiques
à des fins thérapeutiques

- Initialement destinée aux **maladies génétiques monogéniques**

Exemple: mucoviscidose, thalassémie

- ...puis extension du champ d'application

aux maladies **polyfactorielles**

Exemple: cancers, infectiologie

Stratégies de thérapie génique

Thérapie d'addition

Thérapie par réparation de gènes directement dans la cellule

CRISPR Cas9

Modulation de l'expression:Thérapie par saut d'exons

Thérapie par virus oncolytiques

Thérapie génique associée à la thérapie cellulaire

Moyens d'introduction :

Virus défectifs

Retrovirus, adénovirus, lentivirus, AAV

Intégratifs(lentivirus) , non intégratifs(AAV)

Taille max de l'insert:

Myopathie de Duchenne:gène de la dystrophine 2300Kb

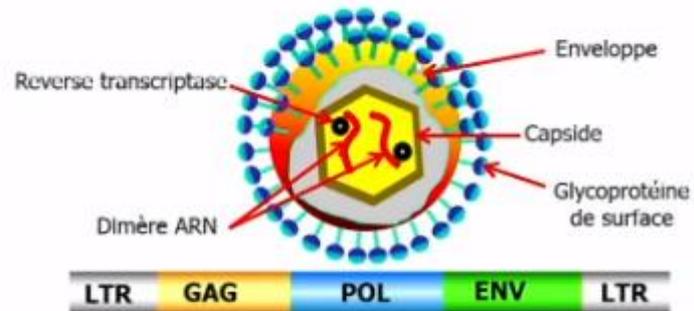
Mucoviscidose : gène CFTR 280Kb

ADN « nu »

Liposomes

Electroporation

Les rétrovirus



- LTR: Long Terminal Repeat (séquence d'intégration)
- GAG: Protéines de la capside
- POL: Reverse Transcriptase
- ENV: Protéines de l'enveloppe

Schéma: livre Krahn, Barra, Bérout
« Génétique et Biotechnologie FACES »
Ed. Ellipses

Rétrovirus recombinant



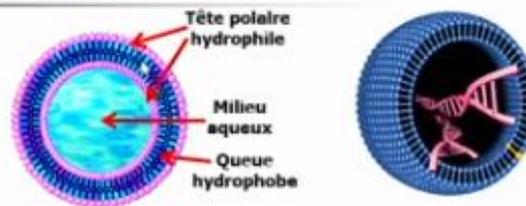
Schéma: Ivo Krihn, Bern, Broud
« Génétique et Biotechnologie PACLS »
Ed. Ellipses

Les liposomes



- Avantages:
 - Très utilisés in vitro
 - Systèmes non viraux
 - Sécurité maximale
 - Protection des gènes
 - Production facile

Les liposomes



- Vésicules sphériques avec des bicouches lipidiques
 - Souvent phospholipides
- Peuvent emprisonner plusieurs composés
 - Dont de l'ADN (des gènes)
- Structure proche des membranes cellulaires
 - Fusionnent avec ces membranes
 - Libèrent leur contenu dans la cellule

Les liposomes



■ Inconvénients:

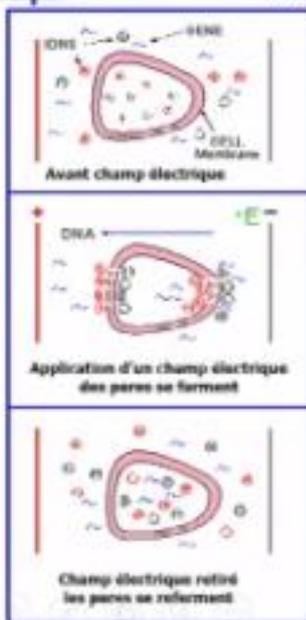
- Efficacité plus faible que virus
- Manque spécificité pour la cible
- Instabilité chimique

■ Avantages:

- Très utilisés in vitro
- Systèmes non viraux
 - Sécurité maximale
- Protection des gènes
- Production facile

Electroporation

Microscopie électronique



Membrane avant pulse



Membrane pendant pulse



Membrane après pulse

- Impulsions électriques
 - Formation transitoire de pores dans la membrane
 - Laisse passer des molécules (Gènes)
 - Pores se referment après arrêt du champ électrique
- Avantages
 - Permet la transfection des cellules quiescentes
 - Facile d'utilisation in vitro
- Inconvénients
 - Résultats (viabilité) très variables selon les cellules

Essais cliniques

Limites

Succès

❖ Cellules souches et thérapie génique

Chez l'homme : correction d'un déficit immunitaire (1999...)

«> maladie des « bébés bulles »

Alain Fischer
Médecin
pédiatre et
immunologiste



« Malgré la survenue de plusieurs cas de leucémies chez les 19 patients inclus, les effets thérapeutiques du traitement persistent encore. **Sur les 9 enfants traités en France il y a plus de 10 ans, 8 sont vivants, à domicile, et suivent une scolarité normale. Sans ce traitement, leur espérance de vie était très limitée.** »
[https://www.Inserm.fr/](https://www Inserm.fr/)

✓ Problèmes :

- **Taille** des gènes
- **Intégration dans le génome** ⇒ cancer, apoptose...
(test chez des souris)

6. Les animaux transgéniques :

6.1 définition

Animal dont le génome a été modifié par l'insertion ou le remplacement d'un ou plusieurs gènes.

1982 : 1er cas de transgènèse

Transgénèse additive :Microinjection

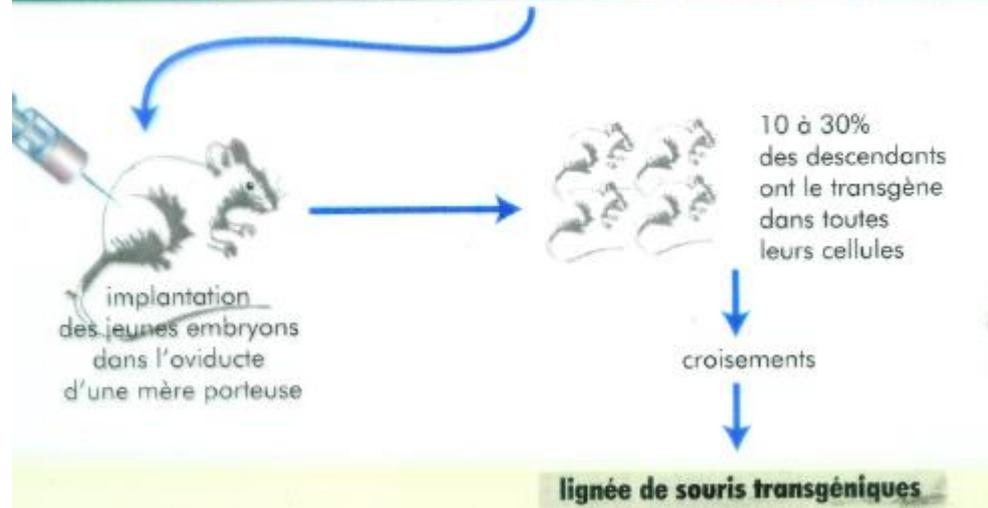
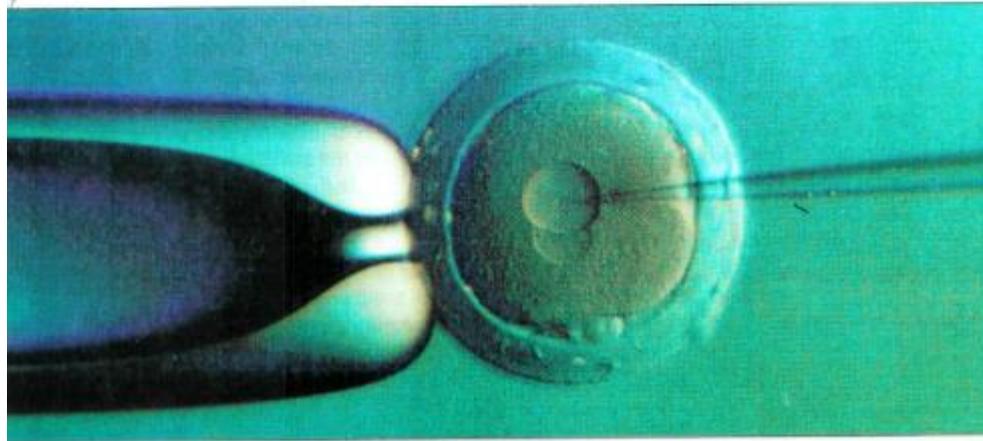
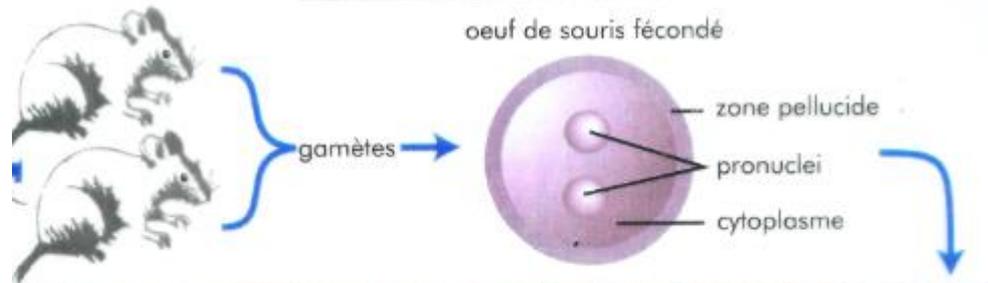
Transgénèse ciblée par technique des cellules embryonnaires(ES)

Transfert nucléaire de cellules somatiques

Clonage reproductif



MICRO-INJECTION DE L'OEUF



6.3 Intérêts

- Informations sur la fonction des gènes (souris Knock out, Knock in)

- Modèles expérimentaux de maladies humaines

- Animaux producteurs de substances utiles

Antithrombine humaine 2007, lait de chèvre

- Greffe d'organes

- Amélioration de la production animale

Agneau riche en oméga 3,2013

7: Les plantes transgéniques(1983, la 1ère)

Objectifs

Plantes résistantes à des insectes, virus, champignons

Plantes résistantes à des herbicides

Plantes produisant des protéines d'intérêt thérapeutique

Plantes dont on améliore les propriétés(conservation, murissement, composition en huiles)

Moyens d'introduction du transgène

Moyens d'introduction du transgène

Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* (bactérie du sol) capable d'infecter les cellules végétales et d'insérer une partie de leur ADN dans les chromosomes de la plante

Electroporation des ζ ou des protoplastes (sans paroi)

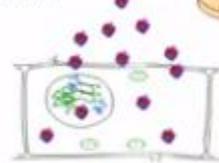
Bombardement par des microparticules (billes de tungstène ou d'or) chargées d'ADN grâce à un pistolet à gènes (biolistique)

Canons à gènes

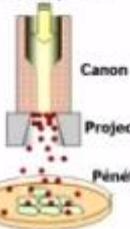
Billes de tungstène
enrobées avec le gène
d'intérêt



ADN des cellules
à modifier



Gaz comprimé



- Microbilles d'or ou de tungstène (1-5 μm)
 - Recouvertes avec gène à transférer
 - Propulsées par un gaz
- Utilisables sur cellules ou tissus
- Avantages:
 - ADN protégé des dégradations
 - Va directement dans noyau
- Inconvénients:
 - Action plutôt superficielle
 - Niveaux d'expression faible

8: Evaluation des risques, AMM

Haut conseil des biotechnologies (HCB)

- les demandes d'utilisation confinée d'OGM pour la recherche, le développement, l'enseignement ou la production industrielle ;
- les demandes d'expérimentation en champ ou de mise en culture de plantes génétiquement modifiées ;
- les demandes de mise sur le marché d'aliments génétiquement modifiés ;
- les demandes d'essais de vaccins vétérinaires obtenus par génie génétique ;
- les demandes d'essais de thérapie génique, etc.

9: Séquençage

1970

1977 Sanger

1987 HGP

1988 Telethon(Bernard Barataud)

2003 La séquence

Côût : 3 milliard d'euros, 15 ans

Projet Encode(2004) : décryptage de la séquence

5' --- ATG GTG GCC ACG AAG ACC TTT GCT CTG CTG CTG CTG TCC CTG
TTC CTG GCA GTG GGA CTA GGA GAG AAG AAA GAG GGT CAC TTC
AGC GCT CTC CCC TCC CTG CTT GTT GGA TCT CAT GCT AAG GTG
AGC AGC CCT CAA CCT CGA GGC CCC AGG TAC GCG GAA GGG ACT
TTC ATC AGT GAC TAC AGT ATT GCC ATG GAC AAG ATT CAC CAA
CAA GAC TTT GTG AAC TGG CTG CTG GCC CAA AAG GGG AAG AAG
AAT GAC TGG AAA CAC AAC ATC ACC CAG AGG GAG GCT CGG GCG
CTG GAG CTC GCC AGT CAA GCT AAT AGG AAG GAG GAG GAG GCA
GTG GAG CCA CAG AGC TCC CCA GCC AAG AAC CCC AGC GAT GAA
GAT TTG CTG CGG GAC TTC CTG ATT CAA GAG CTG TTG GCC TGC
TTG CTG GAT CAG ACA AAC CTC TGC AGG CTC AGG TCT CGG --- 3'

2000 livres de 500pages et 3000 caractères par page

environ 23000 gènes, 1 % codant pour des protéines, +de 50% fonction inconnue

Taille moyenne d'un gène 3Kb, 9 exons

Ver de terre 19000, arabidopsis 25000

99,9% entre 2 personnes

Une nouvelle ère : la médecine personnalisée



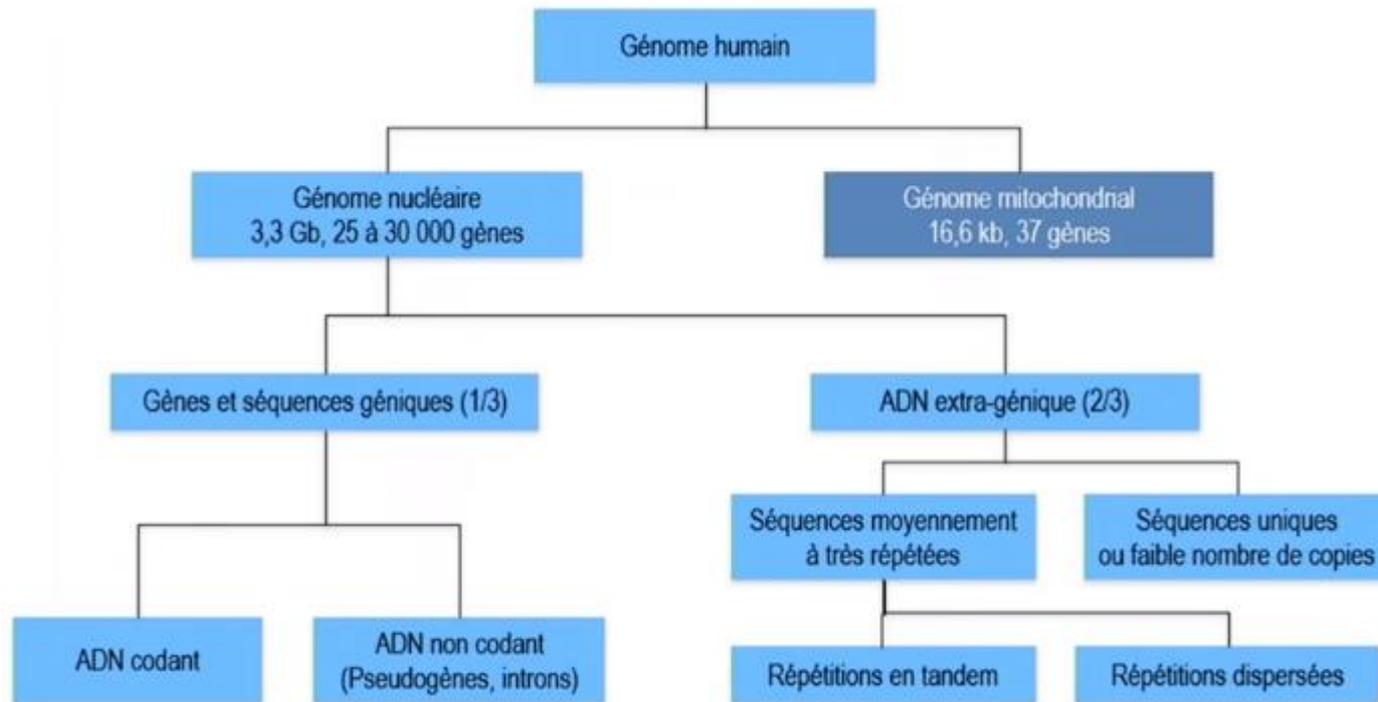
1990-2003

Human Genome Project
Le Génome Humain séquencé
dans un projet international
à **3 milliards de Dollars**



2021

Séquenceurs à Haut Débit
1 Génome Humain en 1 journée
à **300 Dollars**
... mais l'analyse des données reste
difficile !

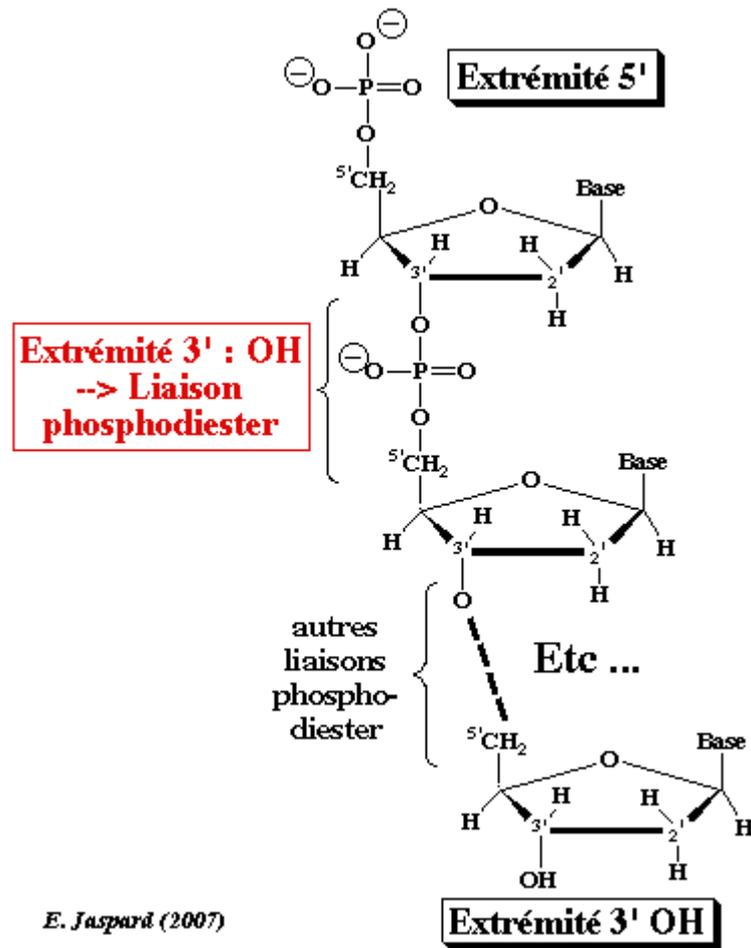


<1% code des protéines

>50% séquences répétées

Cartographie du génome : annotation du génome

- Le nombre total de gènes se situe entre 25 000 et 30 000
- La taille moyenne d'un gène est de 3 000 bases, 9 exons, mais la taille varie beaucoup (ex : le gène de la dystrophine a une taille de 2,4 millions pb)
- 99,9% de la séquence est identique entre deux personnes. Il existe donc 0,1% de différences (soit environ 3,3 millions de différences par génome)
- Plus de 50% des gènes ont une fonction inconnue



E. Jaspard (2007)

Les objectifs du séquençage du génome humain

Plus grand projet scientifique mondial lancé en 1988/1989
Human Genome Project démarre en 1990



Ampleur de la tâche

1 page = 3000 bases

1 tome : 500 pages = 1 500 000 bases

1 génome haploïde = 1 000 tomes !!!

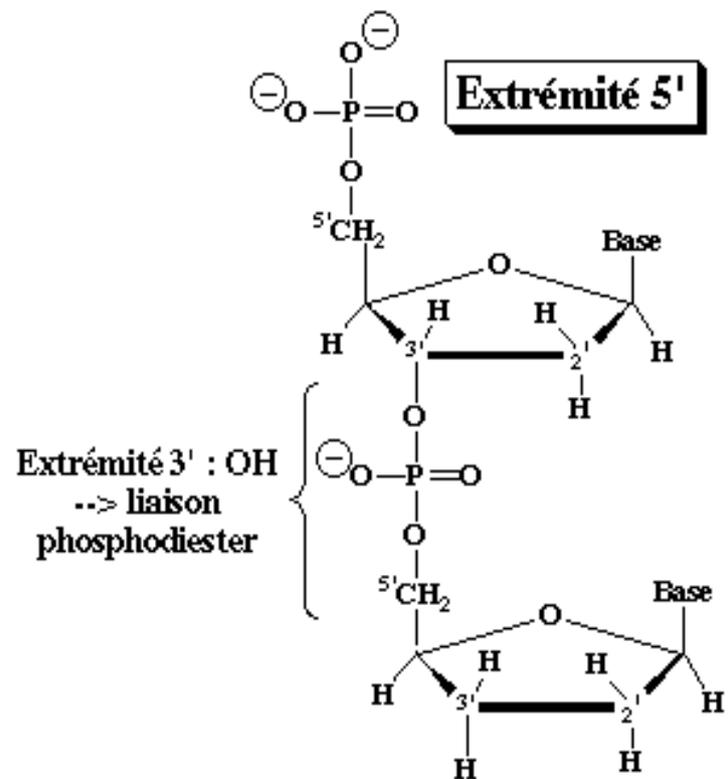
Capacité de séquençage

En 1975, 1 000 nucléotides/semaine ➡ 500 ans pour 100 personnes !

En 1986, 10 000 nucléotides/jour ➡ 8 ans pour 100 machines

En 1998, 200 000 nucléotides/jour ➡ 5 mois pour 100 machines





2', 3' Dldéoxyribonucléotide :
extrémité 3' = H
--> Pas de liaison phosphodiester

Séquençage direct

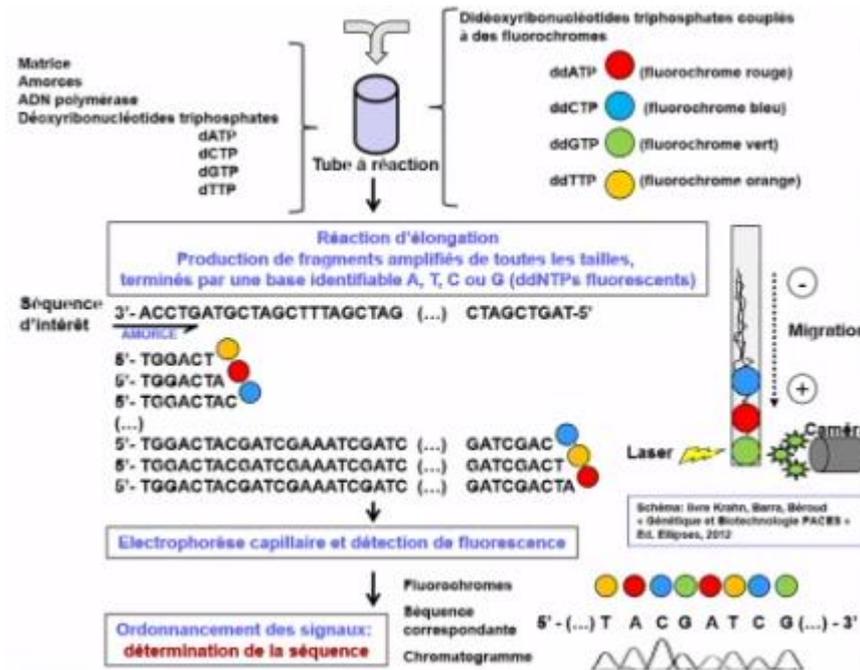
➤ Illustration VIDEO (2min30)

> <https://www.youtube.com/watch?v=N4i8iYYQzY&list=PLF0701633C91835BF>

- Réaction d'élongation avec Incorporation de ddNTP fluorescents
- Production de fragments amplifiés de toutes les tailles
- Séparation des fragments par Electrophorèse
- Lecture par un système laser: pics de fluorescence
- Traitement informatique: reconstitution de la séquence

Notion essentielle à retenir:

Principe du séquençage direct



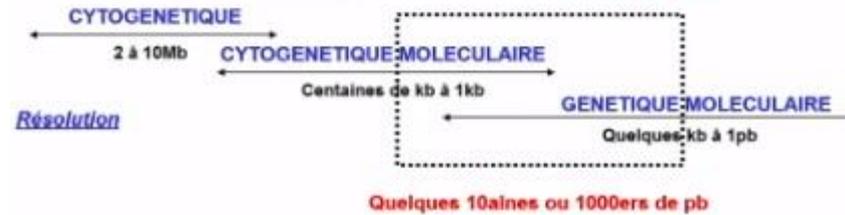
Techniques d'étude d'anomalies du Génome entre Microlésions et Macrolésions

MACROLESIONS

MICROLESIONS

Echelle du Chromosome

Echelle du Gène



- Southern Blot
- CGH array