

**Fiche UE5 Génétique 9 – Génétique médicale et Recherche**

<b>I. L'identification des gènes</b>	
<b>A. Stratégies utilisées</b>	
<b>Approche « gène candidat »</b>	Stratégie utilisée si un chercheur a une <b>idée « géniale »</b> sur la nature du gène qui pourrait être impliqué dans la maladie étudiée : <ul style="list-style-type: none"> <li>· Si connaissance du gène responsable de la fonction altérée dans la maladie</li> <li>· si un gène est connu pour être responsable d'une maladie identique dans une autre espèce</li> </ul> Test du gène chez les malades et détection d'une mutation pathogène. → situation très simple mais très rare
<b>Approche « sans à priori »</b>	Situation la plus courante : pas d'idée sur la nature du gène muté, ou alors les idées que l'on avait sont fausses  On utilise alors les approches de « <b>génétique inverse</b> » : sans à priori sur la nature du gène muté
<b>B. Exemple : le Moyamoya</b>	
<b>1. Présentation de la maladie</b>	
<b>Angiopathie cérébrale</b> caractérisée par : <ul style="list-style-type: none"> <li>· sténose de la terminaison des artères carotides internes (<i>moyamoya en japonais</i>) </li> <li>· réseau de néo-vaisseaux anormaux artériolaires en « volutes de fumée »</li> <li>· symptômes tels qu'infarctus, hémorragies cérébrales, céphalées, épilepsie</li> </ul> Maladie rare : 10 fois plus fréquente au Japon qu'en Europe qui peut toucher les individus dès l'enfance  Faible pénétrance avec un début qui peut être très précoce (dès le 1er jour de vie) – pénétrance achalasie := 100% 	
<b>Anapath</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– hyperplasie irrégulière fibrocellulaire de l'intima</li> <li>– accumulation de cellules positives pour la «smooth muscle actin» </li> <li>– atrophie et déshabitation de la media</li> <li>– absence de cellules inflammatoires et une absence de lésions d'athérosclérose</li> </ul>
Mécanismes physiopathologiques du moyamoya pour l'instant inconnus et absence de modèle animal adéquat	
<b>2. Facteurs génétiques et environnementaux</b>	
Le Moyamoya présente une hétérogénéité clinique et génétique → <u>2 formes</u> :	
<b>Maladie de moyamoya (MMD)</b>	<b>Moyamoya syndromes (MMS)</b>
Angiopathie cérébrale isolée ( <i>aucune autre atteinte ni cause connue</i> ) → 10 % de cas familiaux, avec 80 % de concordance parmi les jumeaux monozygotes → 2 fois plus de femmes que d'hommes touchés Maladie plus polygénique que mendélienne	Angiopathie moyamoya 2ndaire à une cause génétique ou acquise connue, comme : <ul style="list-style-type: none"> <li>· Une irradiation cervico-encéphalique</li> <li>· Les maladies mendéliennes avec faible pénétrance de l'angiopathie moyamoya (<i>NF1, drépanocytose, syndrome de Noonan ...</i>)</li> <li>· Les maladies mendéliennes avec forte pénétrance de l'angiopathie moyamoya (<i>exemple de la maladie de moyamoya associée à une achalasie</i>)</li> </ul>
<b>3. Étude de l'association Moyamoya / achalasie (cf ronéo pour les arbres)</b>	
<b>a) Quel mode de transmission ?</b>	
Sélection de 3 familles touchées par un Moyamoya avec achalasie, familles originaires du Maghreb avec consanguinité	
Mode de ségrégation et consanguinité en faveur d'une transmission autosomique récessive	
<b>Achalasie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– maladie rare</li> <li>– absence de péristaltisme du bas œsophage</li> <li>– défaut du sphincter à se relaxer</li> </ul> A l'imagerie → mégaoesophage et aspect typique d'achalasie lors de la mesure des pressions dans l'œsophage

**b) Déterminer la stratégie pour trouver le gène responsable de la maladie – Quelle approche utilisée ? Comment identifier et localiser le gène responsable ?**

Analyse de liaison entre

- marqueurs polymorphes dont on connaît la localisation chromosomique
- gène que l'on cherche à positionner

→ 2 gènes situés à proximité l'un de l'autre seront transmis ensemble dans la descendance d'un sujet = **liés**Analyse de la **vraisemblance** d'une liaison entre 2 marqueurs pour une distance  $\theta$  de recombinaison donnée, exprimée sous la forme d'un **lod-score**

<b>Lod-score</b>	log décimal du rapport entre la [vraisemblance d'être lié à une valeur de $\theta$ donnée] ET la [vraisemblance de ne pas être lié] :
	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <b>Lod-score</b> &gt; 3 : 1000 fois plus de probabilité d'être lié (<i>1000 chances contre 1</i>)</li> <li>· <b>Lod-score</b> &lt; -2 : 100 fois moins de probabilité d'être lié</li> </ul>
	Permet à la fois d'identifier les régions potentiellement liées / d'exclure des régions dans lesquelles le gène ne peut pas se trouver
<b>Conditions de réalisation</b>	Il faut : <ul style="list-style-type: none"> <li>– des familles informatives (<i>nécessité de plusieurs membres par ex</i>) dans lesquelles le statut de chaque membre a été soigneusement défini</li> <li>– différents types de marqueurs et d'approches technologiques</li> </ul>
<b>Marqueurs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- marqueurs <b>microsatellites</b> : très informatifs, utilisés ++ jusqu'à ces dernières années</li> <li>- maintenant remplacés par les marqueurs de type <b>SNP</b> (Single Nucleotide Polymorphisms) sur « puces » à ADN : marqueurs bialléliques co-dominants correspondant à une variation d'une pb. Ils sont très nombreux et répartis sur l'ensemble du génome           <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Utilisation d'une technologie d'hybridation sur puce ADN (Puces Affymetrix 250K contenant 250 000 SNP)</li> <li>→ Utilisation d'une puce par sujet, qui permet le criblage de l'ensemble de son génome</li> </ul> </li> </ul>

*Exemple dans ronéo***c) Identification du gène causal - Comment identifier le gène causal parmi les 496 gènes localisés dans les régions candidates ?****Séquençage exome entier = whole exome ou WES** = révolution du séquençage → Le WES a permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans des maladies mendéliennes / Technique très puissanteExome entier = 50 millions de pb (*génomome entier = 3 milliards*)L'exome entier chez un individu au hasard = 35000 variants par rapport à la séquence de référence (*génomome entier = 4 millions de variants chez chaque individu*)

<b>Multiples filtres</b> nécessaires pour éliminer les variants non candidats	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <b>mode de transmission</b> : pour une maladie autosomiques récessive → les variants sont présents à l'état hétérozygote chez les parents sains et à l'état homozygote chez les enfants malades</li> <li>· <b>fréquence</b> : si maladie rare → élimination des variants fréquents</li> <li>· nature de la <b>mutation</b> (faux-sens, non-sens...)</li> </ul>
<b>Limites</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Dans une % non négligeable de cas, on ne trouve pas le gène causal</li> <li>· Couverture incomplète : les petites insertions et délétions sont mal détectées</li> <li>· Les grands remaniements (délétion ou duplication de grande taille) et les mutations situées dans introns ne sont pas détectées</li> </ul>

En pratique : (*exemple de la ronéo*)

Séquençage exome entier des 2 cas index des familles F3 et F2 :

- 1 seul gène retrouvé dans les régions candidates identifiées dans la famille F3 + muté dans les 2 familles, F3 et F2
- mutation homozygote, conduisant à un codon stop

**d) Y a-t-il d'autres arguments pour confirmer la nature causale de cette mutation ?**

Recherche d'une **co-ségrégation** des variants avec les autres malades dans F3 et F2 → séquençage du gène dans F1 par Sanger : mutation homozygote retrouvée dans le même gène (Les mutations de ce gène donc bien responsables du moyamoya et de l'achalasie)

- Gène muté GUCY1A3**
- code pour la sous unité alpha 1 de la guanylate cyclase soluble sCG (Rc principal du NO)
  - acteur majeur de la relaxation des cellules musculaires lisses dans les vaisseaux et le tractus digestif (motilité).
  - pas impliqué dans les autres formes « récessives » de la maladie de moyamoya (MMD)

Applications de l'identification du gène :

- Applications cliniques immédiates par arrêt de l'errance diagnostique : tests diagnostiques, des conseils génétiques, des diagnostics prénataux désormais possibles...
- L'identification d'un gène ouvre la possibilité de création d'un modèle animal
- Meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques (indispensable pour le développement d'approches thérapeutiques)

**II. Modèles animaux**

- valider une hypothèse (gène candidat ou mutation candidate) grâce à un modèle animal
- étudier la fonction normale d'un gène
- Ce sont des modèles expérimentaux des maladies humaines → meilleure compréhension des mécanismes physiopathogéniques, et qui permettent d'établir des stratégies thérapeutiques (élaboration et validation préclinique)

**A. Stratégies utilisées**

**Mutation chimique aléatoire / mutagenèse dirigée**

= « bombardement » d'agents mutagènes, qui créent des mutations rapides au hasard

1. Obtention d'une collection de mutants
2. Phénotypage de ces mutants
3. Identification le gène muté (*très long*)

Exemple d'une colonie de souris ENU avec hémorragies cérébrales périnatales et porencéphalie :

1. Agent mutagène ENU: agent alkylant
2. mutations ponctuelles dans l'ADN des spermatogonies → mutation dans le gène Col4a1
3. Les souris mutées obtenues présentes des hémorragies cérébrales périnatales + porencéphalie

**Transgénèse insertionnelle classique**

But : addition d'un gène donné afin de surexprimer ce gène, avec ou sans modification génétique

Méthode : Micro-injection d'un transgène dans des ovocytes fécondés réimplantés chez une souris

+	Toute séquence d'ADN peut être injectée
-	Intégration du transgène <ul style="list-style-type: none"> <li>· rare (3-10% selon la qualité de l'ADN et de l'expérimentateur)</li> <li>· aléatoire dans le génome (<i>site le plus souvent unique</i>)</li> <li>· en multiples copies (<i>nombre variable → conditionne le niveau d'expression</i>)</li> </ul>
Elle peut aussi se faire dans un gène essentiel	

**Criblage génétique et recombinaison allélique**

But : intégrer un gène donné au sein ou à la place de son homologue génomique

La **recombinaison homologue** permet d'échanger ou d'insérer une séquence d'ADN en un endroit précis du génome (*très rare*)

On peut ainsi :

- « invalider » un gène (knock-out)

**Méthode CRISP-Cas-9**

= révolution technologique, qui permet un temps d'analyse beaucoup plus court

**Cas9 (CRISPR associated protein 9)** : endonucléase capable de couper chacun des 2 brins d'un ADN, permettant ainsi d'éditer le génome (remplacement d'un gène par un autre)

Composée :

- d'ARN guide constant, attaché à une séquence spécifique de l'ADN à cibler

<ul style="list-style-type: none"> <li>introduire une mutation dans un gène de la souris (knock-in) → étude de la fonction d'un gène, la modélisation d'une maladie récessive ou une de la perte de fonction</li> </ul> <p><u>Principe</u> : Introduction d'une modification génétique dans le génome de cellules totipotentes (cellules ES) par recombinaison homologue et réimplantation des cellules dans un blastocyste de souris</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>d'une protéine Cas9 qui accueille cet ARN, guide le positionnement de cet ARN sur l'ADN-cible et découpe les deux brins d'ADN à la position correspondante</li> </ul>
<p><b>B. Différents modèles animaux</b></p>	
<p><b>Souris</b></p>	<p>Physiologie assez proche de celle de l'homme  Elevage facile, temps de génération court (~ 21 jours)  → permettent une connaissance complète du génome : manipulation de son génome techniquement accessible et lignées « pures »</p>
<p>La levure, ver nématode, poisson, insecte..</p>	
<p><b>Rat</b></p>	<p>Transgénique et KO</p>
<p><b>Gros animaux (porc)</b></p>	<p>Transgénique et plus récemment ciblage génique (très chers, réservés à des recherches spécifiques)</p>
<p><u>Quels modèles animaux utiliser pour l'étude d'une maladie génétique humaine ?</u></p> <p>Possibilités extrêmement diverses (technologie, espèce)  Design du modèle animal est conditionné :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Par la maladie (mode de transmission et nature des mutations)</li> <li>par la question posée</li> </ul> <p><b>Très rare d'avoir un modèle animal récapitulant la maladie humaine à l'identique</b> → intérêt de <b>l'analyse combinée</b> de différents modèles</p> <p>Les modèles animaux sont <b>incontournables</b></p>	
<p><b>C. Exemples des angiomes caverneux</b></p>	
<p>20 % des cas familiaux : MAD et symptomatiques dans la majorité des cas</p> <p>3 gènes identifiés : <b>MGC4607 et KRIT1 sur le Chr 7 &amp; PDCD10 sur le Chr 3</b> / Aucune homologie de séquence entre les 3 protéines  Toutes les mutations = <b>codon STOP</b> prématuré → mutations perte de fonction</p> <p><u>Modèles animaux d'angiome caverneux permettent de :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>comprendre le rôle des gènes CCM dans l'angiogénèse cérébrale normale</li> <li>comprendre comment la perte de ces gènes entraîne l'apparition d'angiomes → Quels types cellulaires requièrent la présence des protéines CCM pour un dvlp vasculaire normal au sein du SNC ?</li> </ul>	
<p><b>Stratégies d'invalidation de CCM2 chez la souris</b></p>	<p><u>Méthode</u> : Recombinaison homologue en floxant les souris de 2 sites LOX autour du gène CCM2 et en les croisant avec des souris exprimant la recombinase Cre dans tous les tissus ou dans des tissus spécifiques  → 3 modèles de souris KO pour le gène CCM2 afin de comprendre la maladie :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Un KO du gène dans tous les tissus de la souris</li> <li>Un KO du gène « tissus spécifique » au niveau des cellules endothéliales</li> <li>Un KO du gène « tissu spécifique » au niveau des précurseurs des neurogliaux</li> </ul> <p><b>CCM2</b> : rôle essentiel dans l'endothélium vasculaire E10</p> <p>Obtention d'un modèle survivant après la naissance pour l'analyse du développement de ces vaisseaux : développement d'un modèle iCCM2 inductible et tissu spécifique = délétion spécifique et inductible du gène CCM2 dans l'endothélium vasculaire par des promoteurs inductibles contrôlant l'expression de Cre à différents moments. Invalidation du gène par injection de Tamoxifène</p> <div data-bbox="1375 1043 2092 1257" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p><u>Résultat</u> :</p> <p>Délétion de CCM2 dans les cellules endothéliales → mort précoce des embryons</p> <p>Délétion du gène dans les précurseurs neurogliaux → pas de phénotype</p> </div>