

Génétique Humaine : Génotypage et Diagnostic

Daniel PERAZZA

(daniel.perazza@ujf-grenoble.fr)

Maître de conférences – UFR Chimie-Biologie
Université Grenoble Alpes



Rappel : Programme de la Formation 2015

2015 – Niveau 1 : Aspects Cellulaires

9h – 10h30	Notions théoriques sur les caryotypes et la FISH
10h30 – 12h	<i>Visite du laboratoire de Génétique hémato-oncologique (IBP)</i>
12h-13h30	Pause repas
13h30 - 15h	Notions théoriques sur le FACS
15h – 16h30	<i>Visite et démonstration de la Plateforme de FACS de l'IAB</i>

2016 – Niveau 2 : Aspects Moléculaires

PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR et qPCR)

Programme de la Formation 2016

2016 – Niveau 2 : Aspects Moléculaires

9h00-12h

- **Rappels : Maladies et Fardeau Génétique**

- **Les Séquences Polymorphes**

- RFLP
 - VNTR
 - SNPs
- } origine, méthodes de détection, utilisations en génotypage humain (diagnostic et police scientifique)

- **PCR Quantitative en Temps Réel** ; *préparation d'une plaque pour qPCR*

- **PCR Numérique**

PAUSE REPAS

13h30-16h30

- **Manipulation de données de qPCR** ; *Suivi de la qPCR sur un LightCycler 480*

Les « Maladies du Génome »

Maladies génétiques chromosomiques (formule chromosomique \neq 46 chr)

trisomies / monosomies / polyploïdies

Maladies génétiques sporadiques (mutations dans les cellules somatiques)

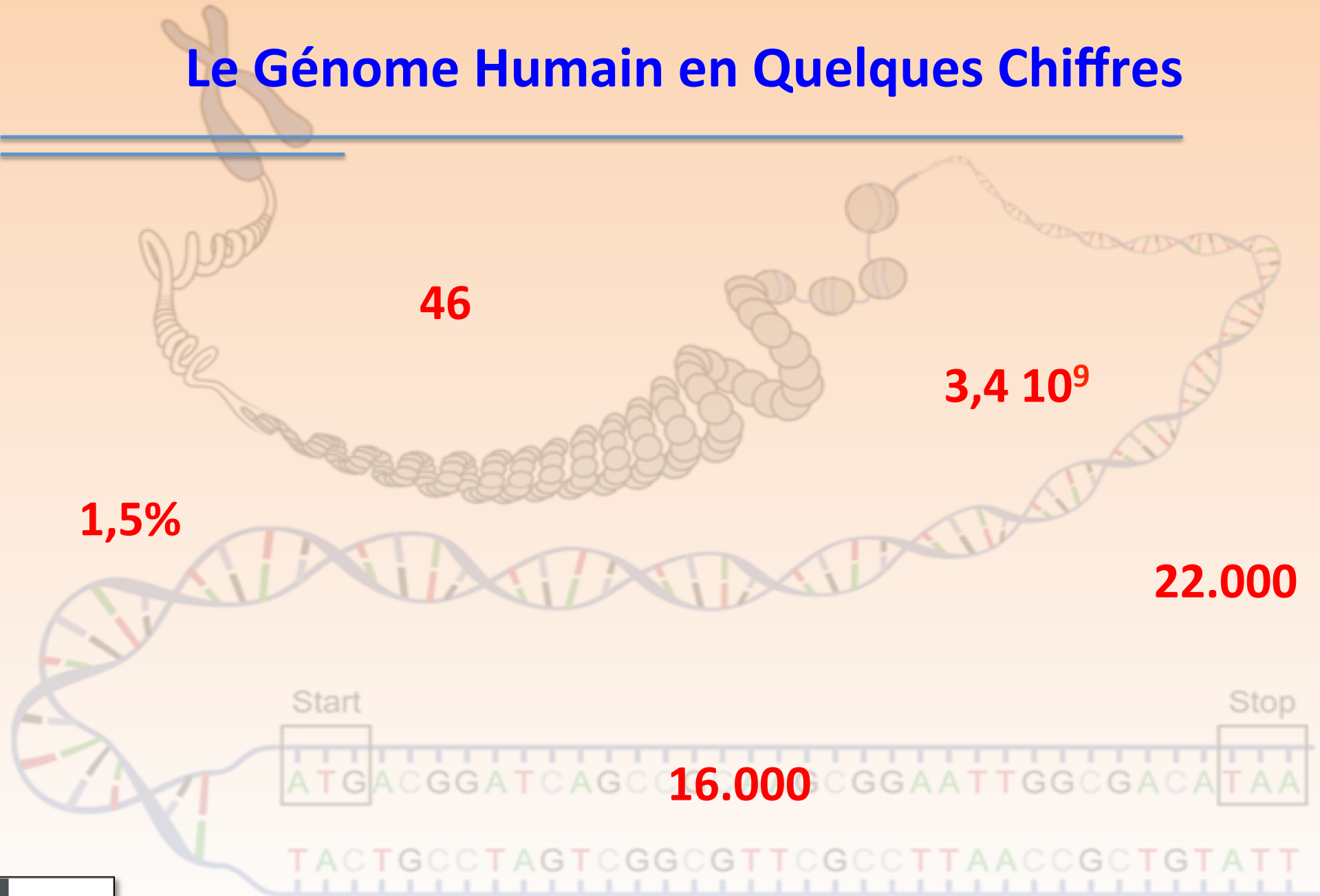
Cancers

Maladies génétiques transmissibles (mutations dans les cellules germinales)

- monogéniques / multigéniques
- récessives / dominantes
- autosomiques / liées au sexe

Ex: mucoviscidose, myopathie de Duchenne, chorée de Huntington, anémie falciforme, hémophilie, etc.

Le Génome Humain en Quelques Chiffres

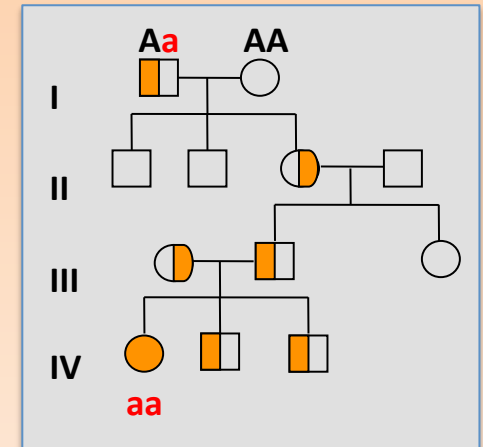


L'Homme n'est pas un Bon Modèle Génétique

- ❖ Croisements ciblés
- ❖ Temps de génération
- ❖ Taille du génome

Les Maladies Monogéniques Récessives

- "sautent" souvent des génération (propagation silencieuse)
- sont transmises à la fréquences de 50% par les parents porteurs sains
- **pertes de fonction**



Ex : Xeroderma Pigmentosum

Fréquence : 1:1.000.000 Europe et USA (env. 40 malades en France)
1:100.000 Japon et Maghreb



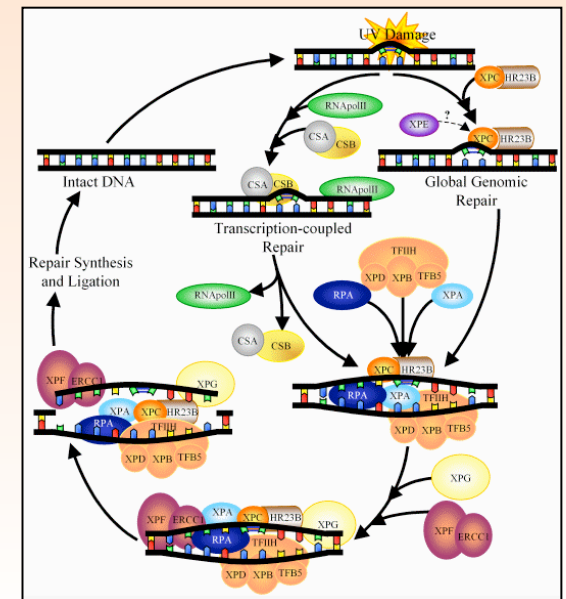
7 gènes XP contrôlent la réparation de l'ADN endommagé par les UV : XPA, XPB, ..., XPG.

XPC : la plus fréquente

XPB : extrêmement rare (3 cas au monde)

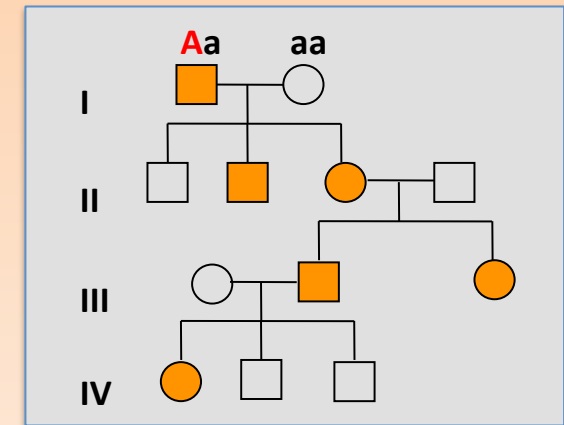
XPF forme bénigne (réparation lente)

etc.



Les Maladies Monogéniques Dominantes

- ne "sautent" pas de génération
- sont transmises à la fréquences de 50%
- **gain de fonction**



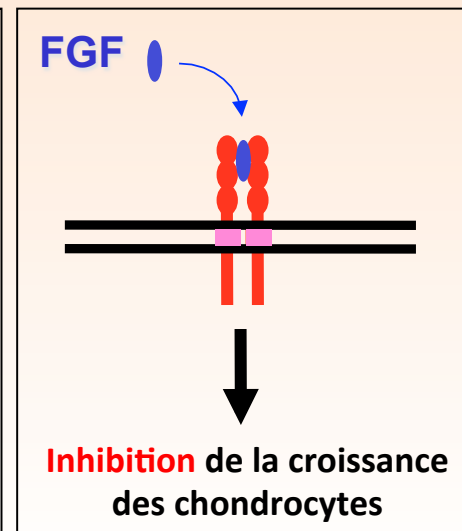
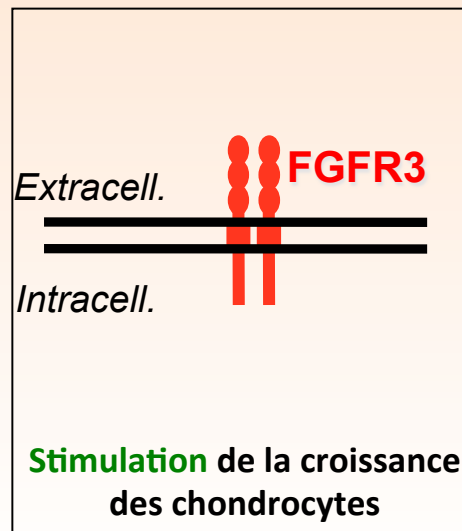
Ex: Achondroplasie

Fréquence : 1:15.000

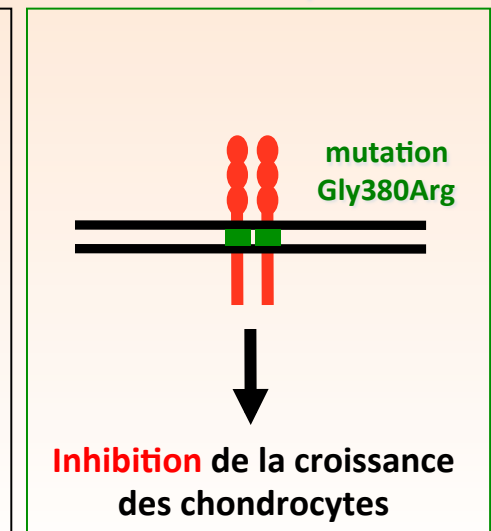
Mutations souvent sporadiques



Individus sains

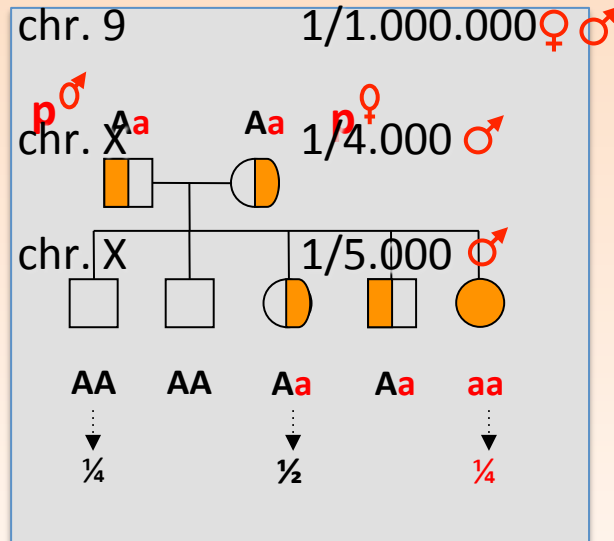


Achondroplasie



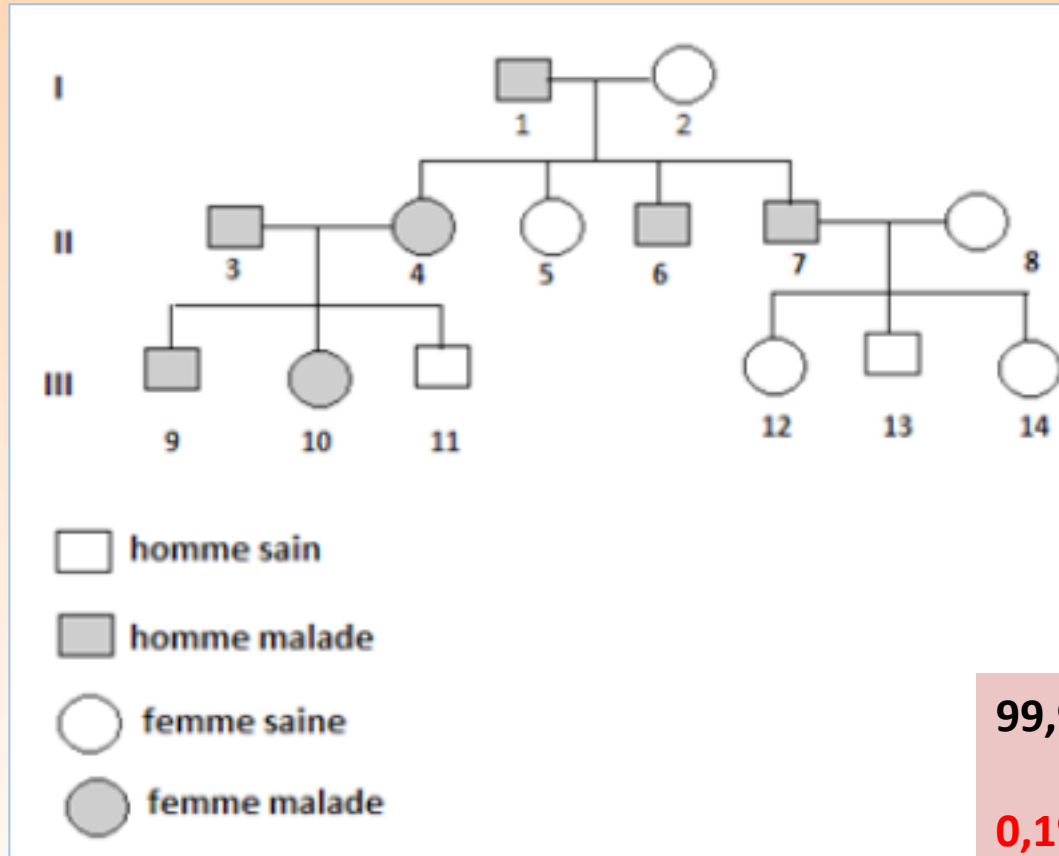
Le Fardeau Génétique

Maladies	position	prévalence	porteurs sains
Mucoviscidose	chr. 1	1/4.000 ♀♂	1/30
Xeroderma pigmentosum (XPA)	chr. 9	1/1.000.000 ♀♂	1/500
Dystrophie de Duchenne (myopathie)	chr. X	1/4.000 ♂	1/2.000 ♀
Hémophilie A	chr. X	1/5.000 ♂	1/2.500 ♀
... et quelques milliers d'autres			



Nécessité de - repérer l'ensemble des gènes dont la mutation engendre une maladie -> cartographie
 - connaître la fonction des protéines codées par ces gènes -> clonage

Liaison Génétique et Marqueurs Moléculaires



Objectif :

Identifier la région du génome portant le gène en question (afin de le cloner).

Comment :

Trouver une séquence d'ADN polymorphe (variable, marqueur moléculaire) qui co-ségrège avec la maladie.

99,9% génome identique entre tous les humains

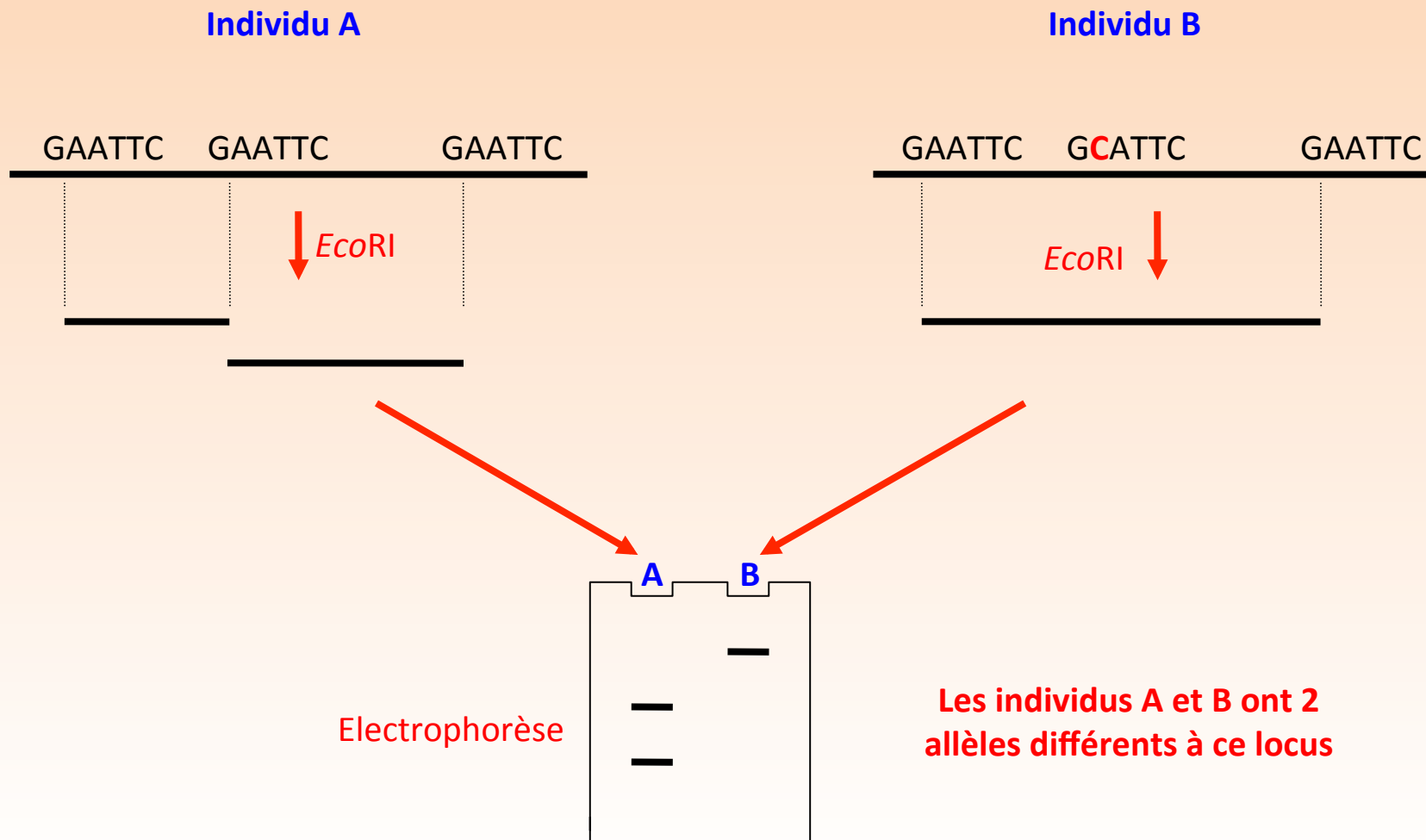
0,1% ADN polymorphe :

substitutions

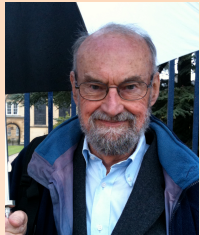
délétions / insertions

Les Marqueurs RFLP

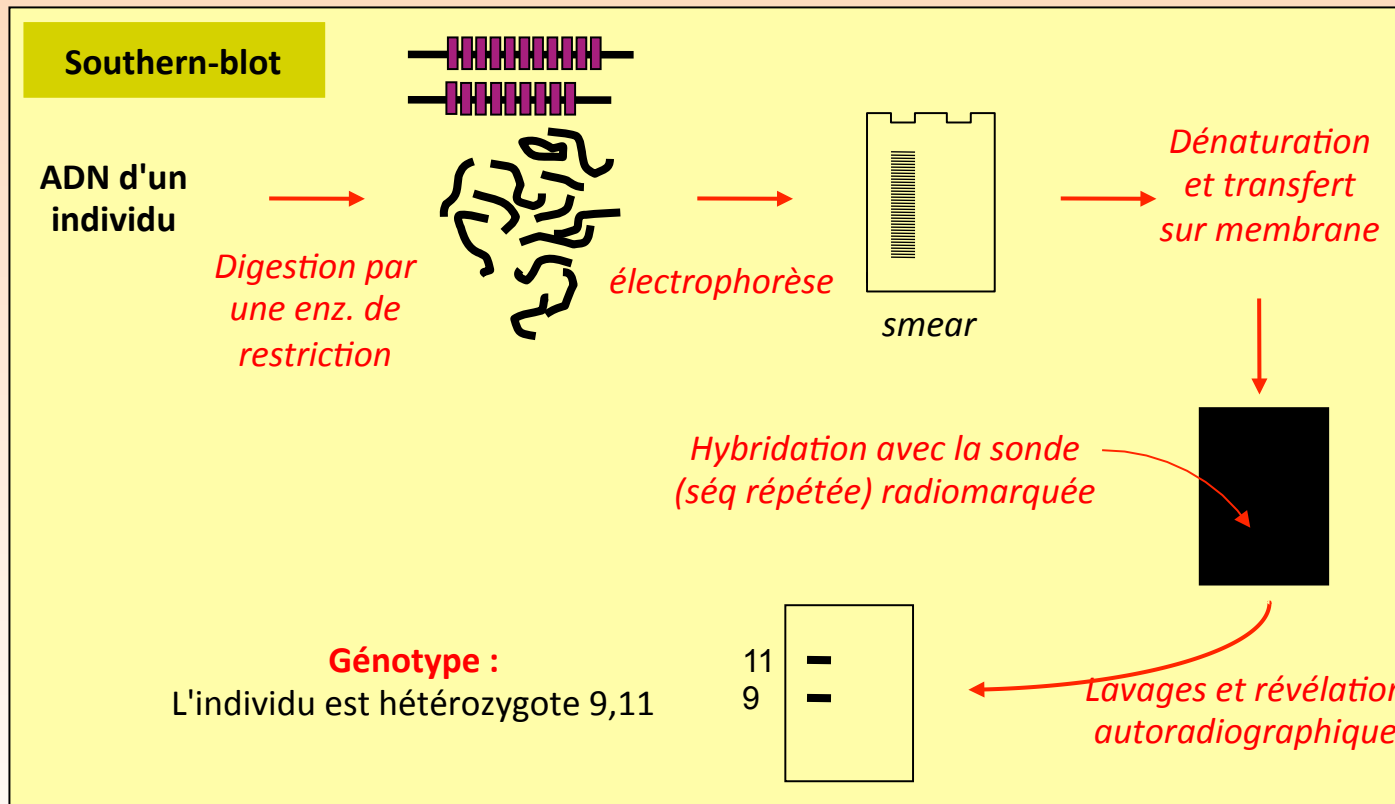
Des mutations ponctuelles peuvent faire apparaître/disparaître des sites reconnus par les enzymes de restriction.



le Southern Blot



Edwin Southern
(UK)



Utilisation des Marqueurs RFLP pour Diagnostic

Drépanocytose ou anémie falciforme (sickle-cell disease)

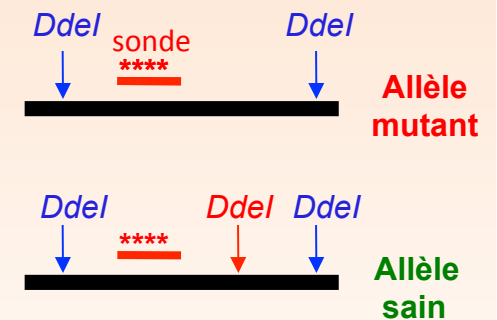
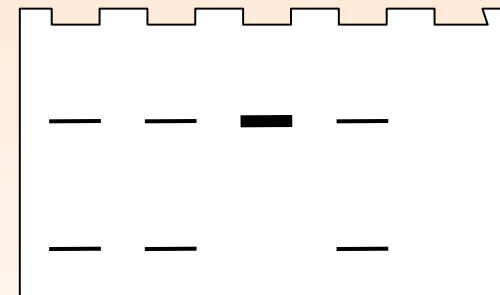
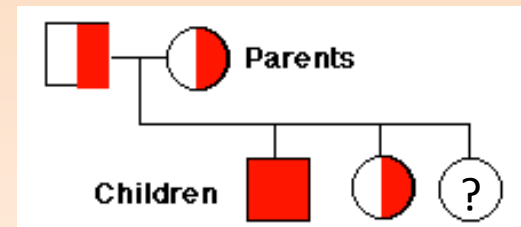


Allèles :

	Thr	Pro	Glu	Glu	
Sain	...A C T	C C T	G A G	G A G...	beta ^A gene
Mutant	...A C T	C C T	G T G	G A G...	beta ^S gene
	Thr	Pro	Val	Glu	

mutation ponctuelle

fait disparaître le site de restriction **CTNAG** reconnu par l'enz. *Ddel*.

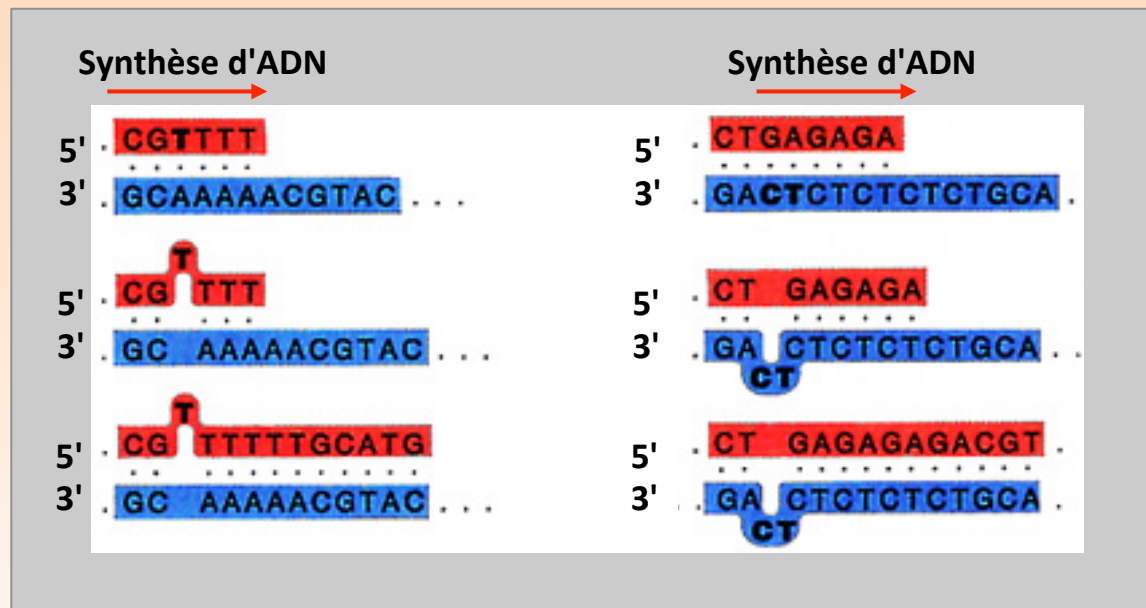


→ Diagnostic prénatal disponible

Origine de la Variabilité des VNTR

Modèle de Streisinger

Le glissement du brin néosynthétisé provoque une addition de nucléotide(s).



Le glissement du brin matrice provoque une délétion de nucléotide(s).

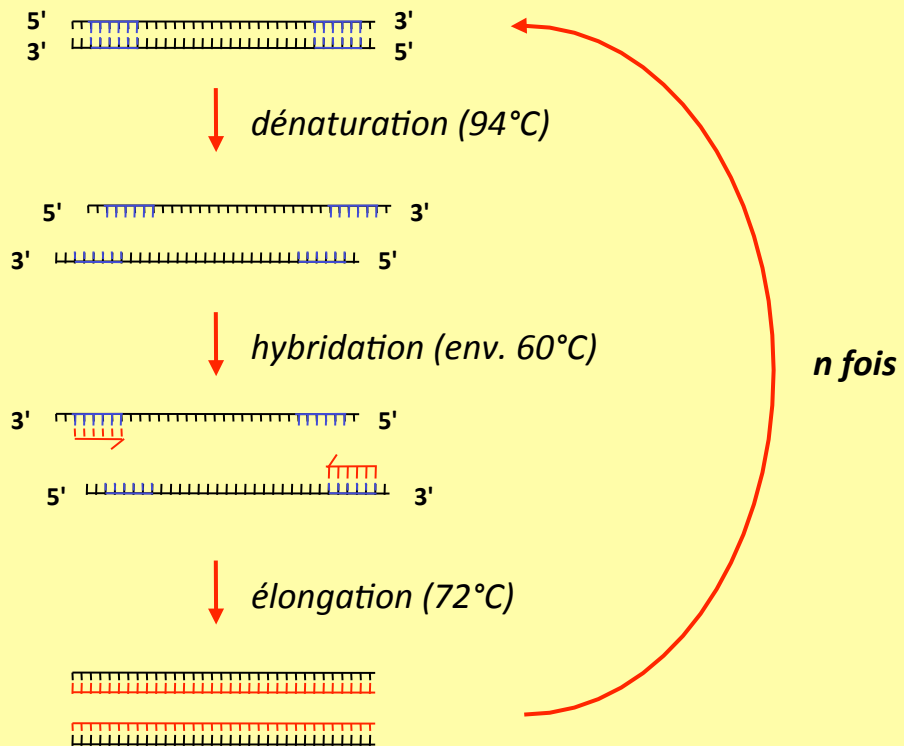
**Points chauds (hot spots) des génomes :
---> Zones de répétitions de courtes séquences**

La PCR



Kary MULLIS
(Nobel 1993)

Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)



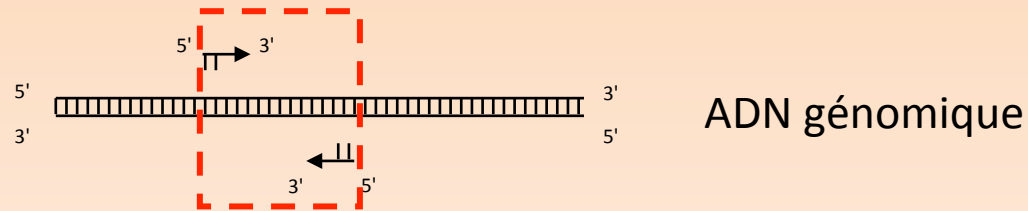
1 copie

↓ 30 cycles

1. 10⁹ copies

La PCR

Séquence souhaitée
à amplifier



Question:

Combien de molécules souhaitées obtient-on théoriquement après

- 1 cycle de PCR
- 2 cycles
- 3 cycles
- ...
- 30 cycles