

# Génétique Humaine : Maladies et Diagnostics

---

**Daniel PERAZZA**

(daniel.perazza@ujf-grenoble.fr)

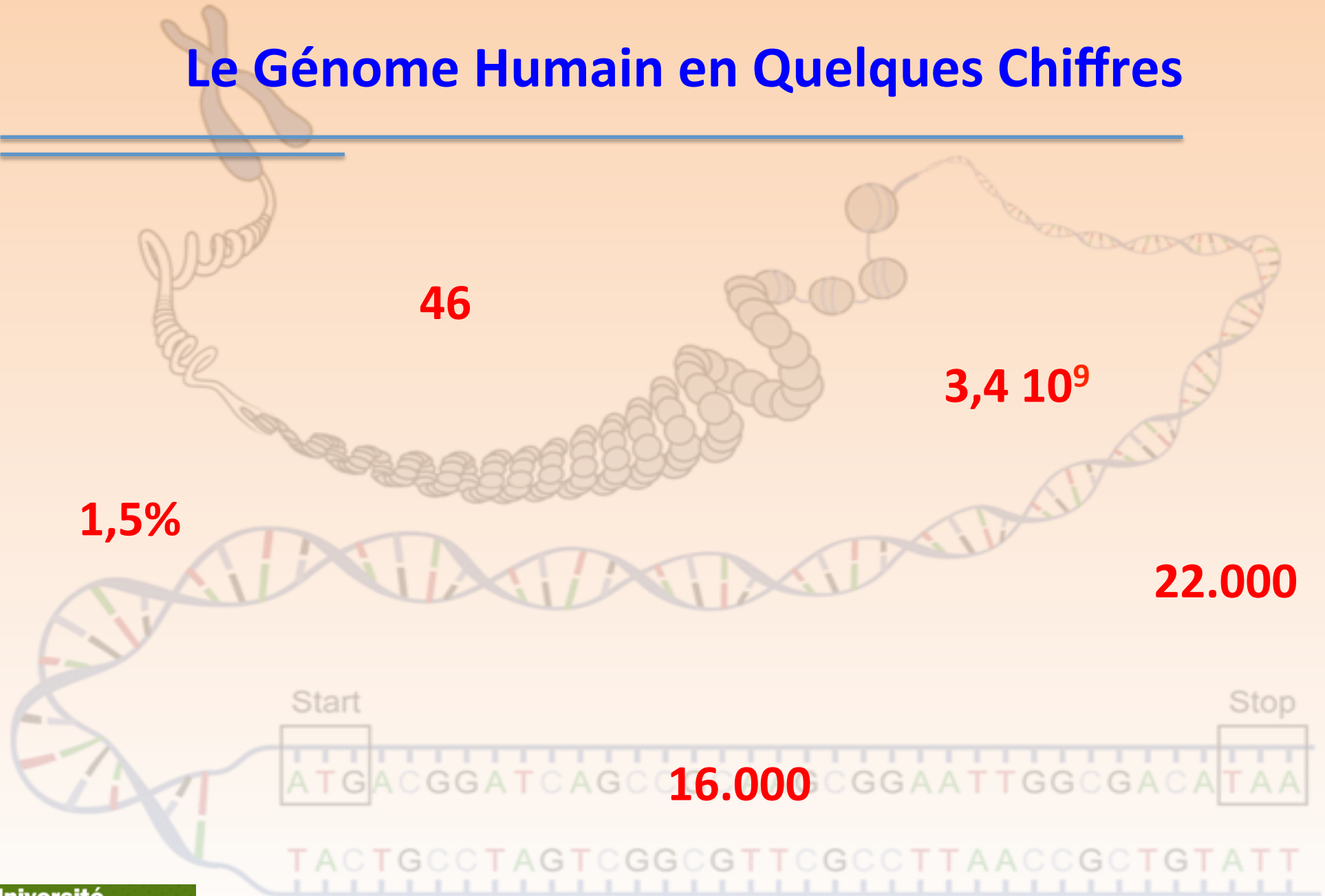
Maître de conférences – UFR Chimie-Biologie  
Université J. Fourier



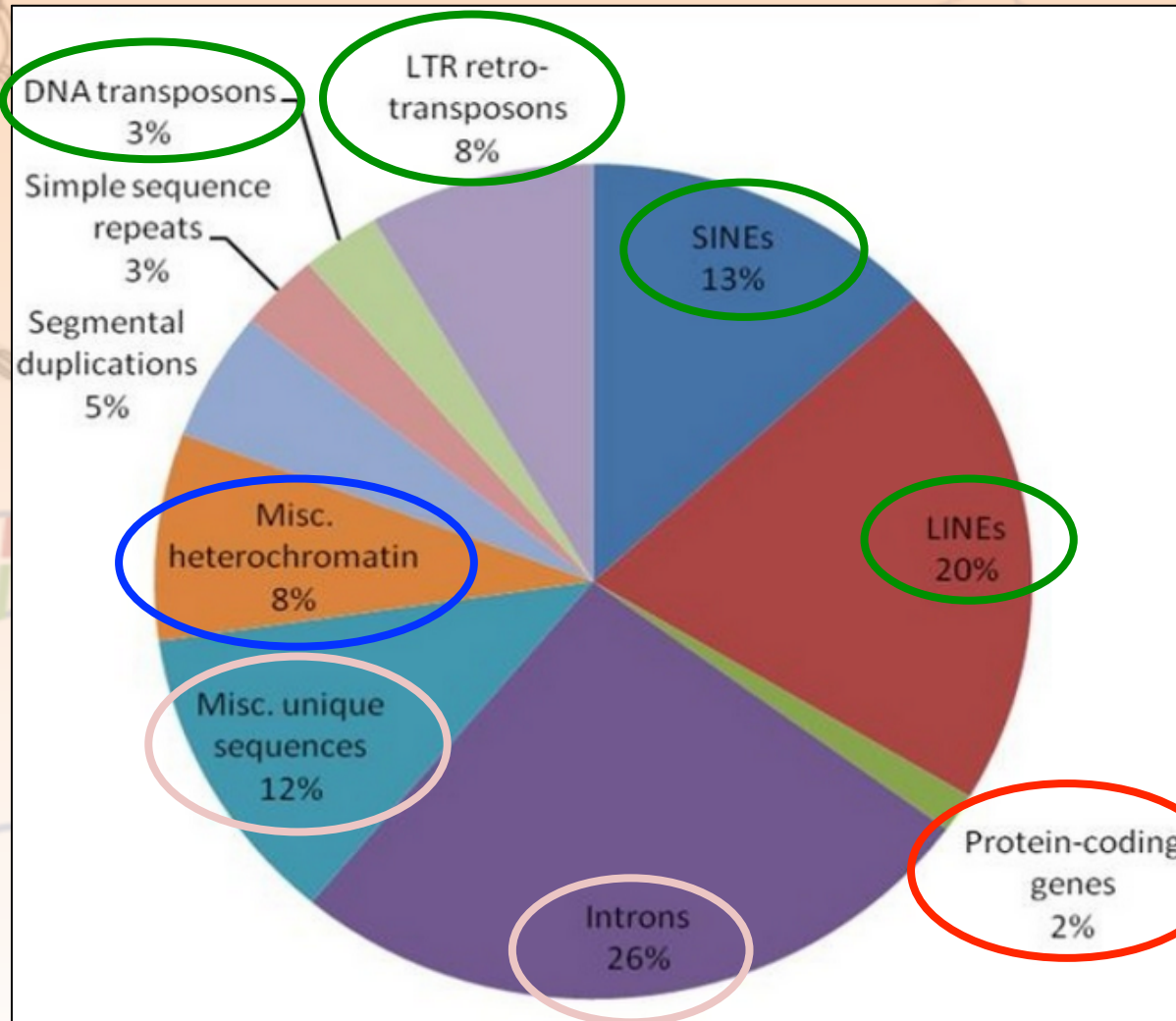
Institut Albert Bonniot



# Le Génome Humain en Quelques Chiffres



# Le Génome Humain : Structure Générale



# Les Maladies Génétiques

---

## Maladies génétiques transmissibles (mutations)

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

## Maladies génétiques chromosomiques (formule chromosomique $\neq$ 46 chr)

- trisomies / monosomies / polyploïdies

## Maladies génétiques sporadiques (cellules somatiques)

- cancers

# Les Différents Niveaux du Diagnostic

Visuel

Imagerie

Bactériologique

Biochimique

Cellulaire

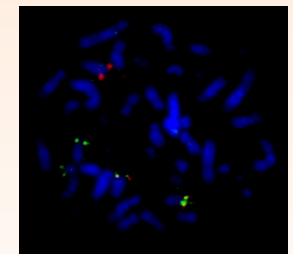
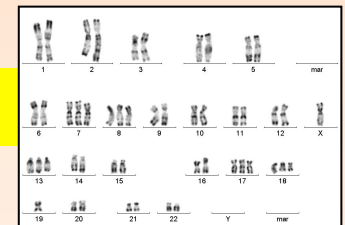
Moléculaire

Cytogénétique

FACS

Conventionnelle

Moléculaire



# Caryotype

---

---

## Obtention et analyse des chromosomes en métaphase

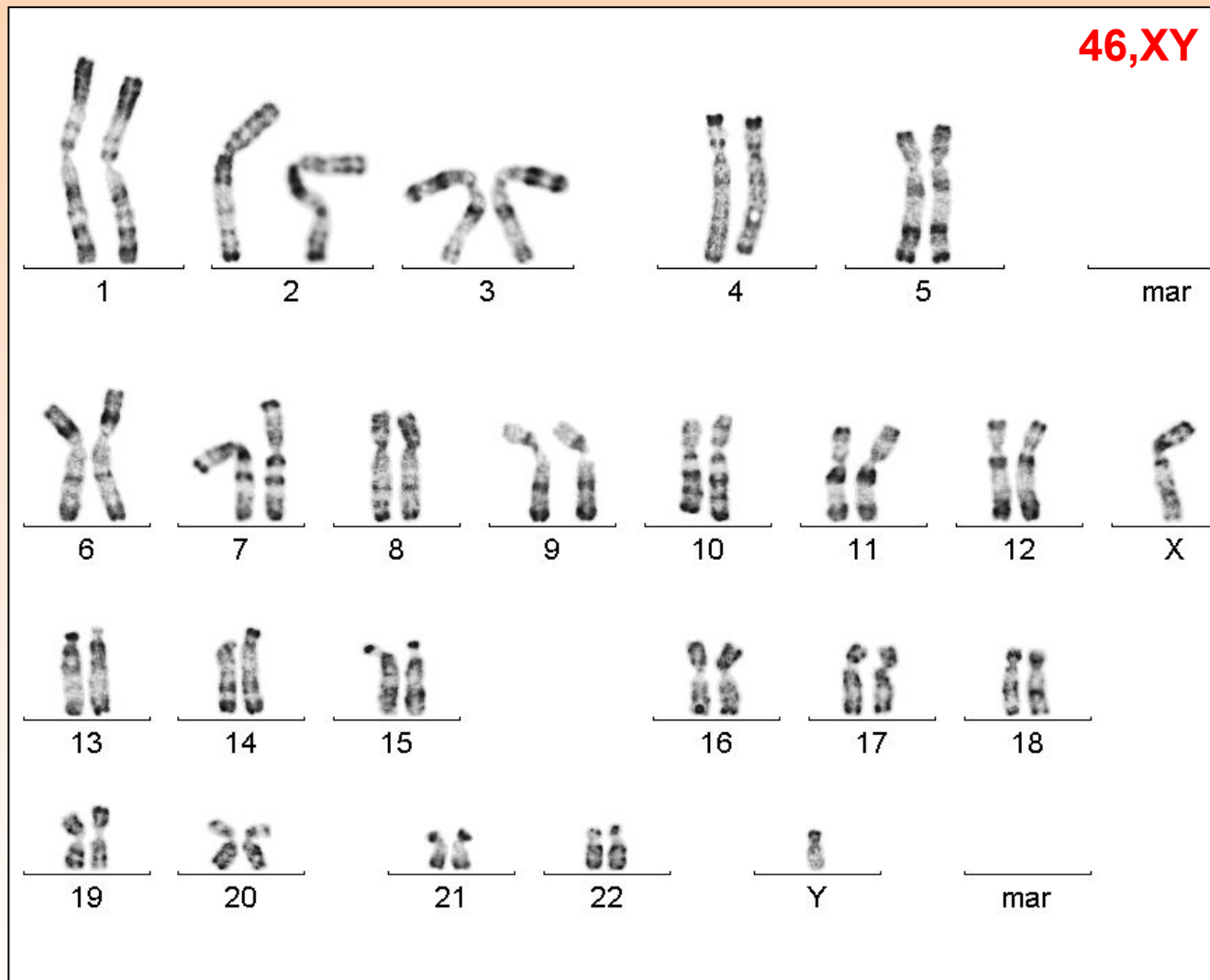
Dénombrement

Analyse morphologique

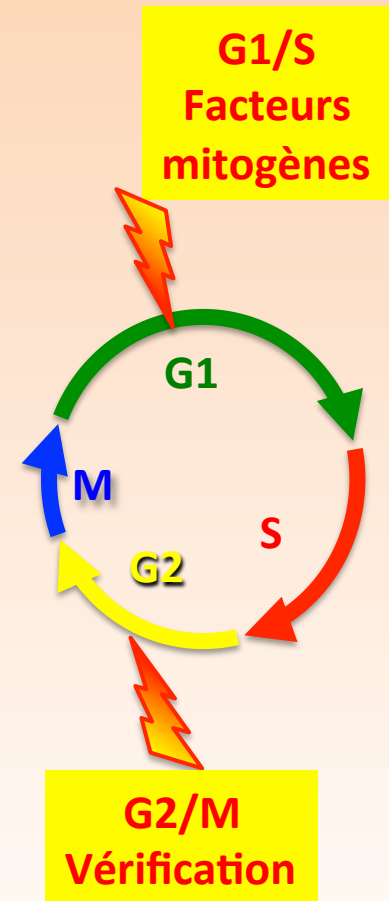
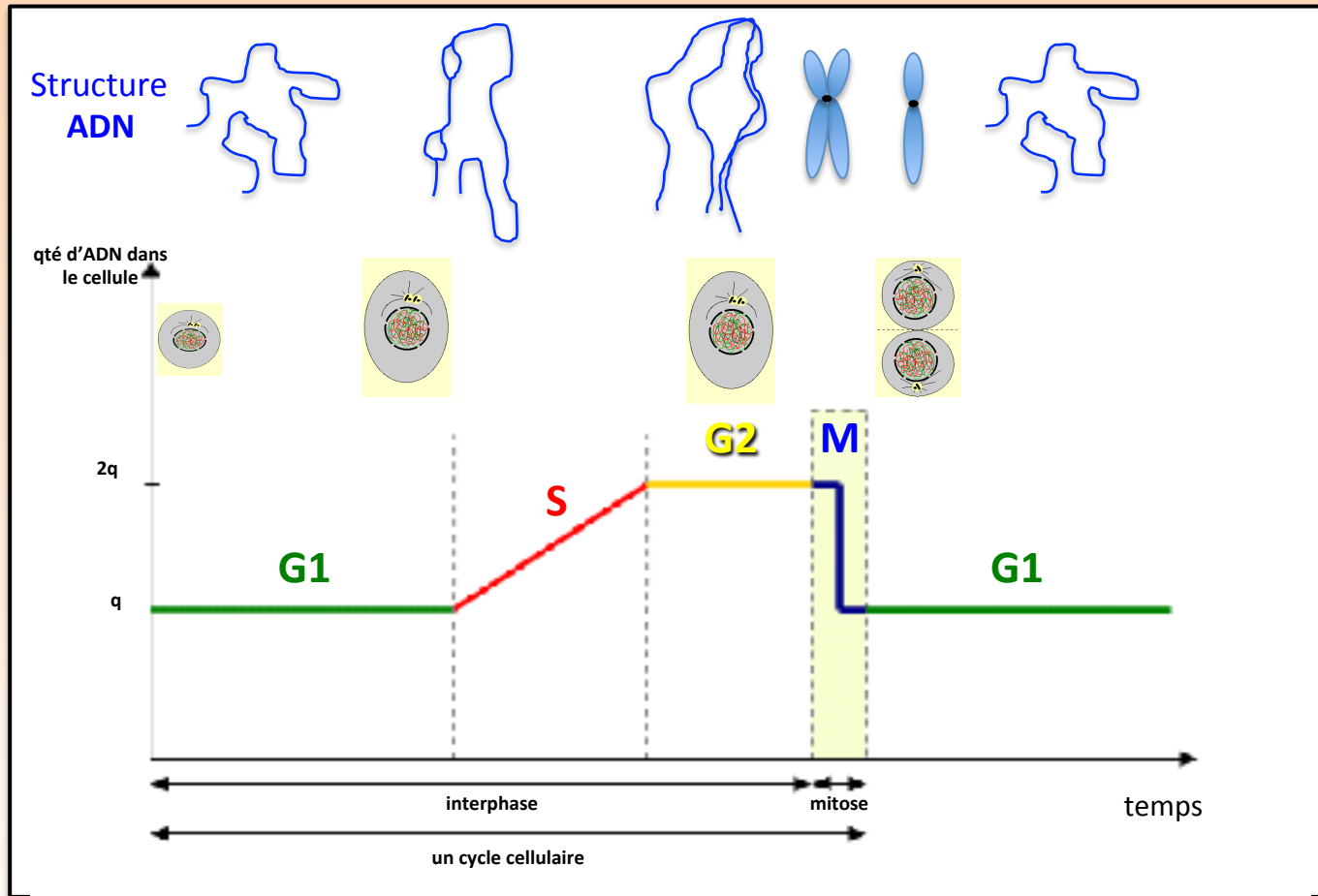


**Diagnostic d'anomalies chromosomiques**

# Caryotype Normal

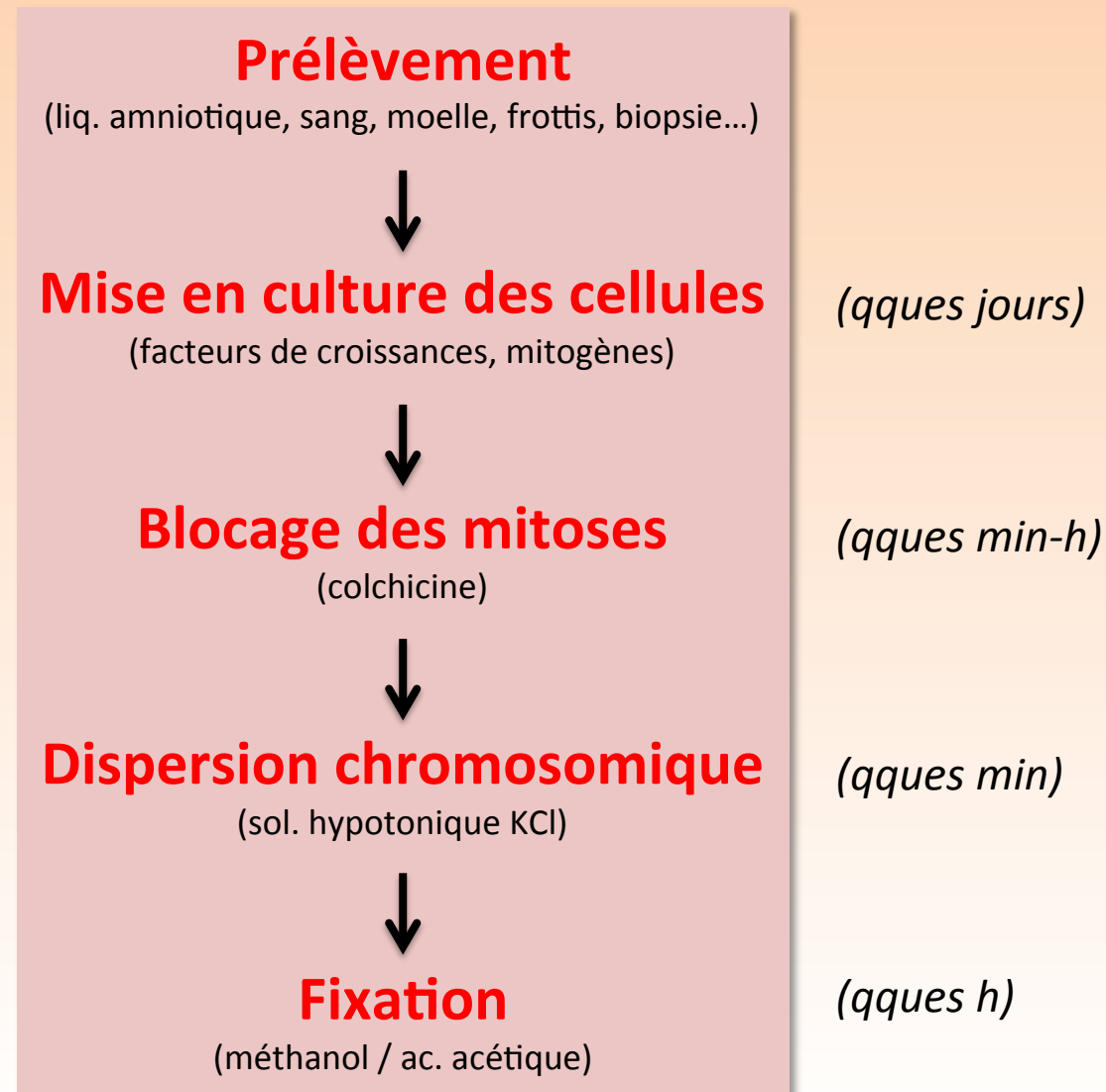


# Le Cycle Cellulaire





# Caryotype : Obtention de Chromosomes Métaphasiques



# Caryotype : Colorations

**Etalement sur lame**

**G banding**

(Giemsa)



**Protéolyse**

(trypsine)



**Coloration Giemsa**

(éosine + azurs méthylène)



**Observation / Acquisition / Classement**

(microscope + logiciel d'analyse d'image)

**R banding**

(Reverse)



**Dénaturation**

(87°C)



**Coloration Giemsa**

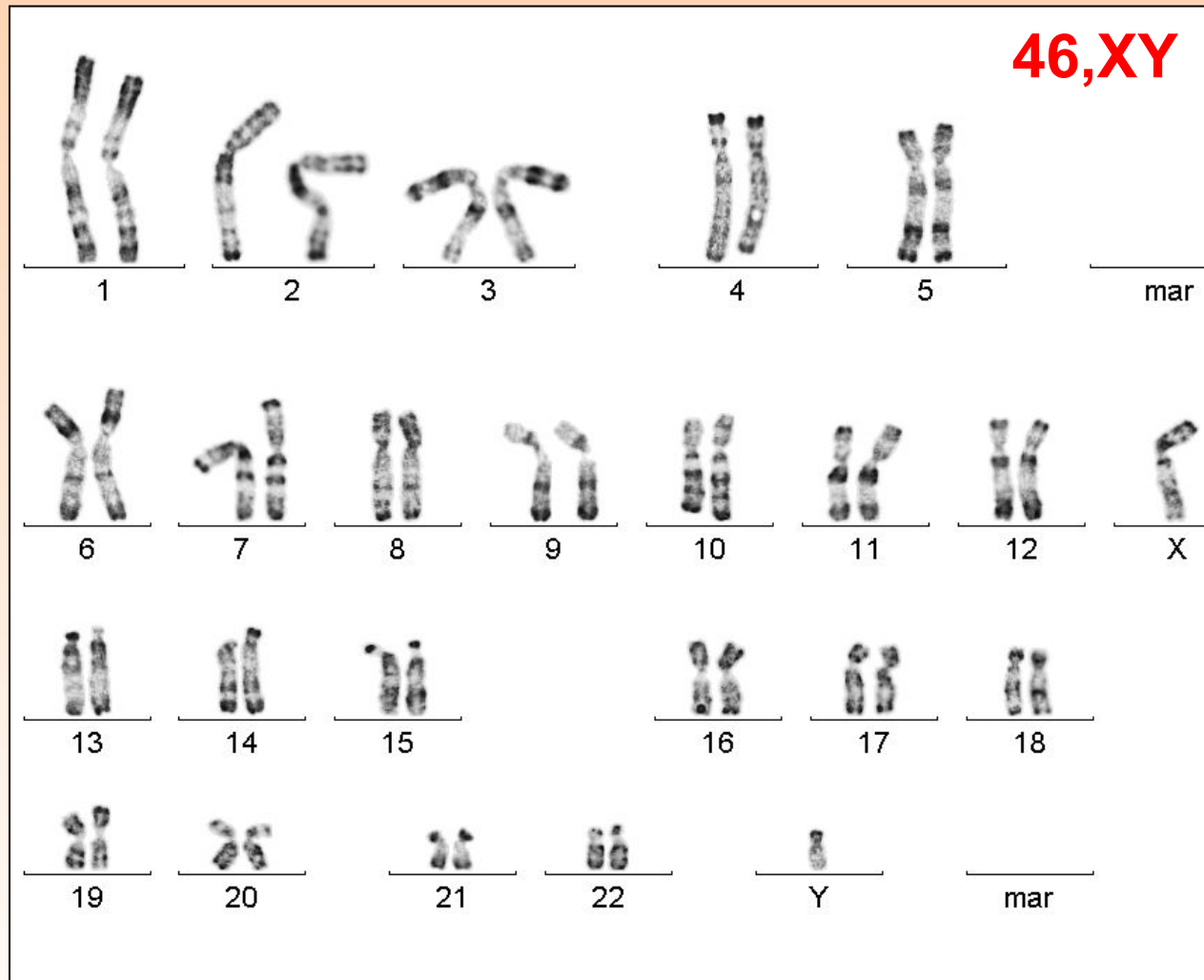
(éosine + azurs méthylène)



**Bandes sombres:**  
Riches en A:T  
(pauvres en gènes)

**Bandes sombres:**  
Riches en G:C  
(riches en gènes)

# Caryotype en Bandes R



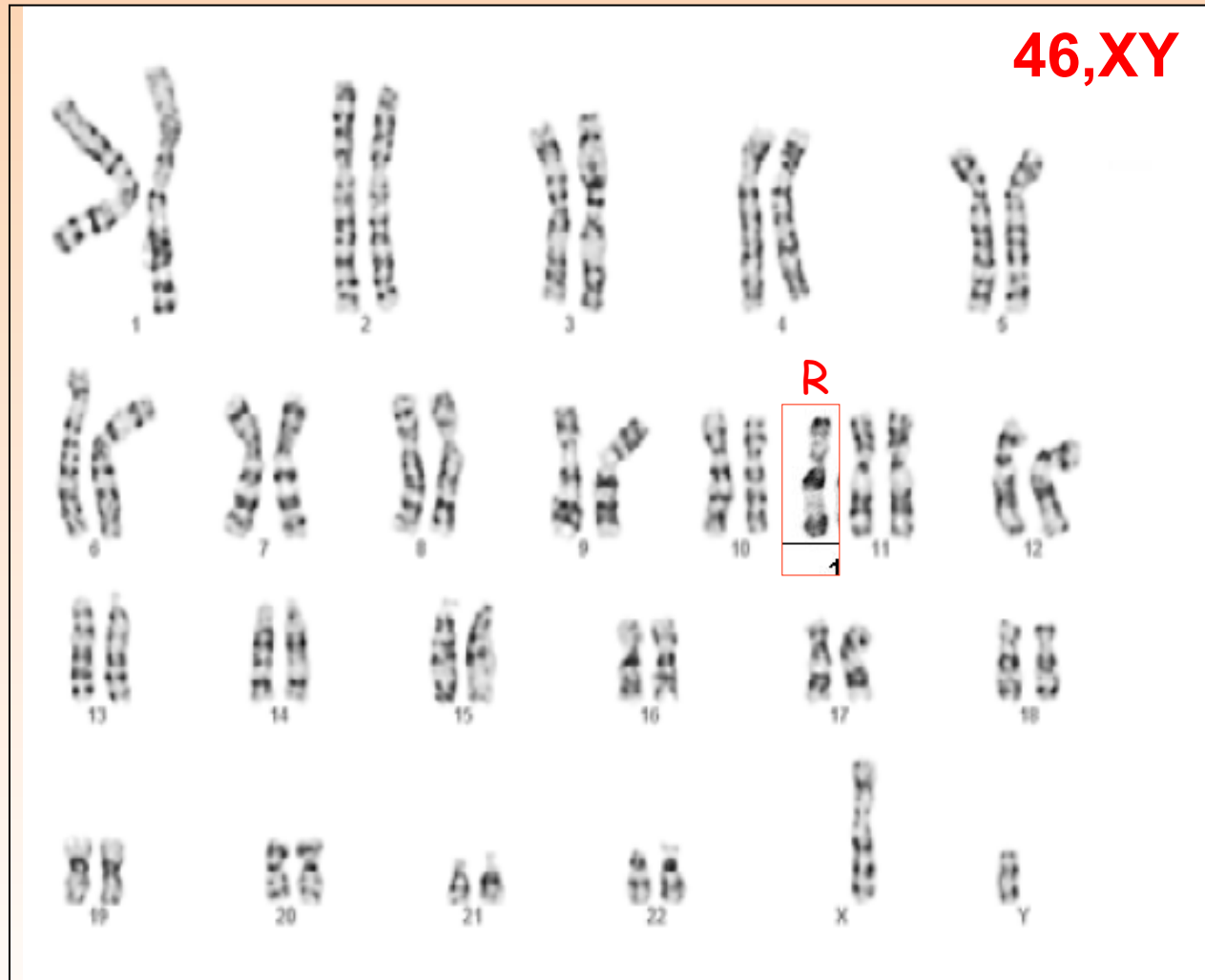
C. Lefebvre – IBP Grenoble

# Caryotype en Bandes G



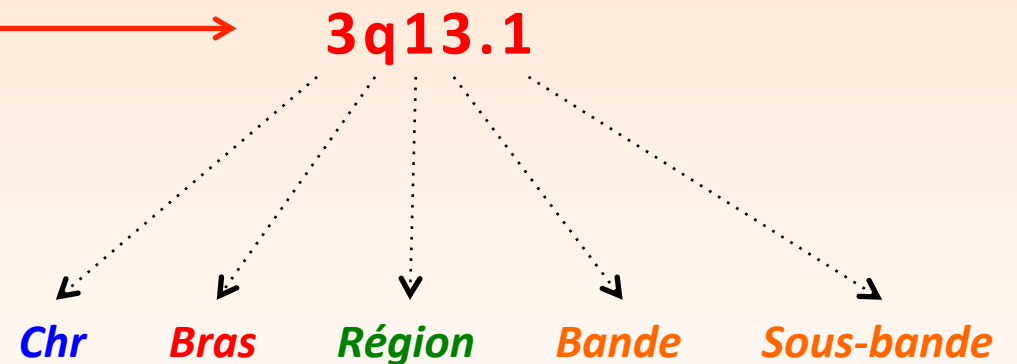
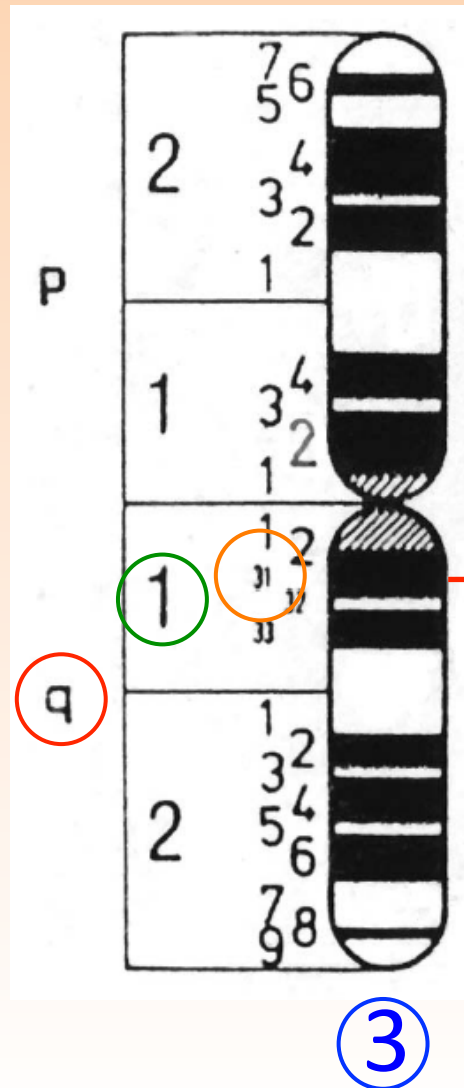
C. Lefebvre – IBP Grenoble

# Comparaison de Caryotypes en Bandes G vs R



C. Lefebvre – IBP Grenoble

# Nomenclature Bandes & Sous-Bandes Chromosomiques



# Utilité du Caryotype

## Détection d'anomalies chromosomiques

### 1- anomalies de nombre

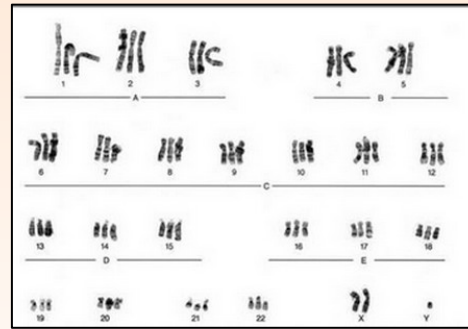
- trisomies 21, X (femme), Y (homme), 18, 13
  - tétrasomies (XXXX ; XXYY), pentasomie (XXXXX)
  - monosomies X
  - triploidie
- >  $2n+1$   
->  $2n+2$  ;  $2n+3$   
->  $2n-1$   
->  $3n$



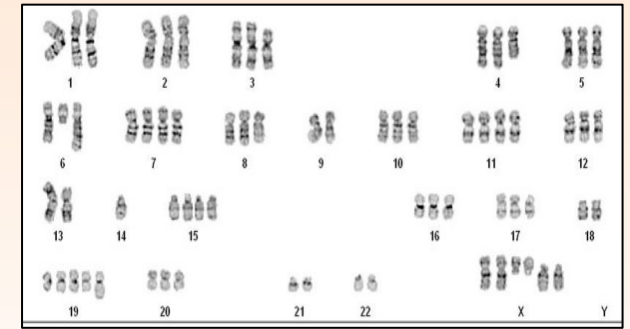
47, XX, +21



45, X



69, XXY



carcinome

# Utilité du Caryotype

---

## Détection d'anomalies chromosomiques

### 2- anomalies de structure

- équilibrées : ni perte, ni gain d'ADN
- déséquilibrées : délétion, duplication

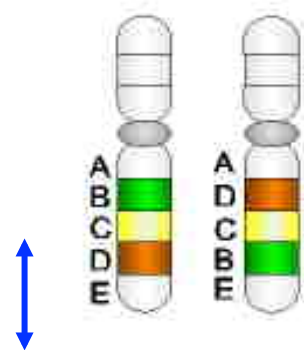


# Quelques Anomalies de Structure Chromosomique

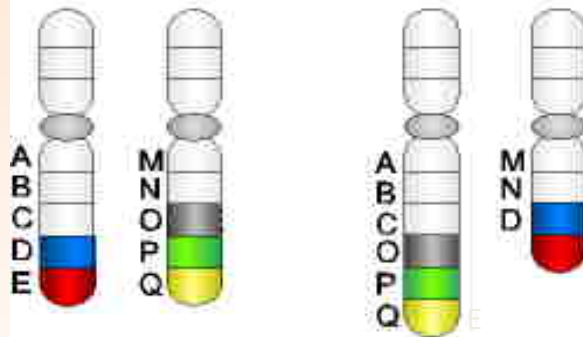
équilibrées

déséquilibrées

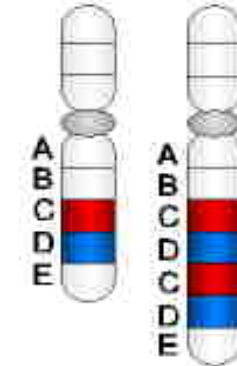
inversion



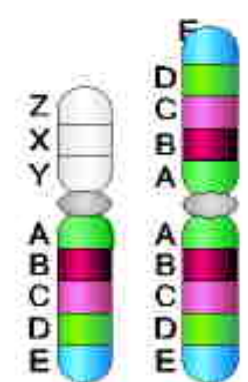
translocation  
réciproque



délétion



duplication



isochromosome

# Intérêts & Limites d'un Caryotype

---

**Analyse pangénomique**

**Détection d'anomalies de nombre et de structure**

**Échec de mise en culture**

**Si caryotype normal : nature des cellules en mitose?**

**Pouvoir de résolution : 1 bande = 5-10Mb**

# Les Différents Niveaux du Diagnostic

Visuel

Imagerie

Bactériologique

Biochimique

Cellulaire

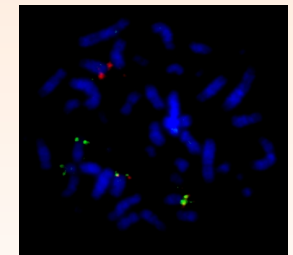
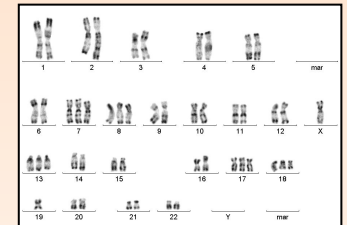
Moléculaire

Cytogénétique

FACS

Conventionnelle

Moléculaire



# FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization

---

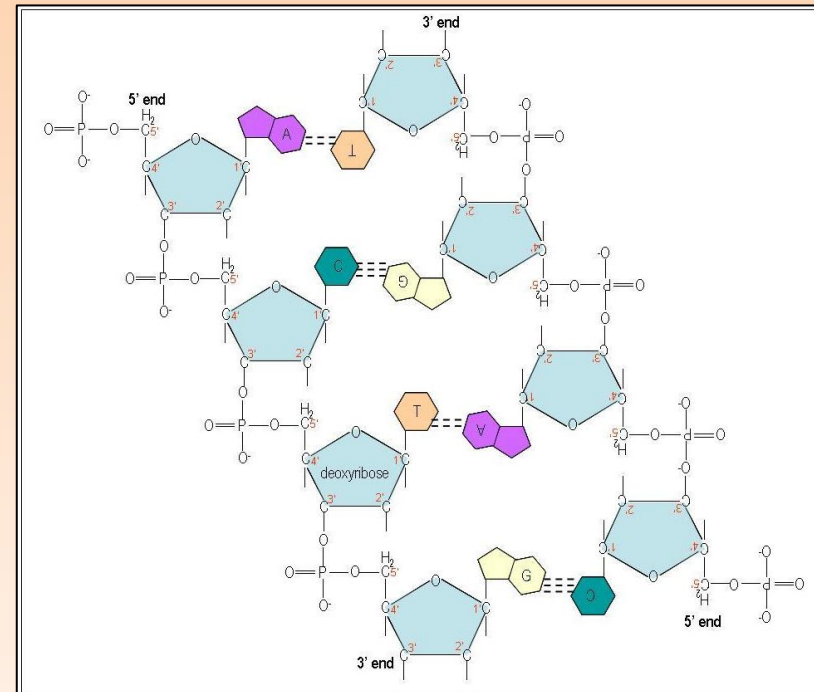
---

Détection *in situ* de séquences d'ADN



**Question : comment identifier/repérer une séquence d'ADN particulière dans un génome?**

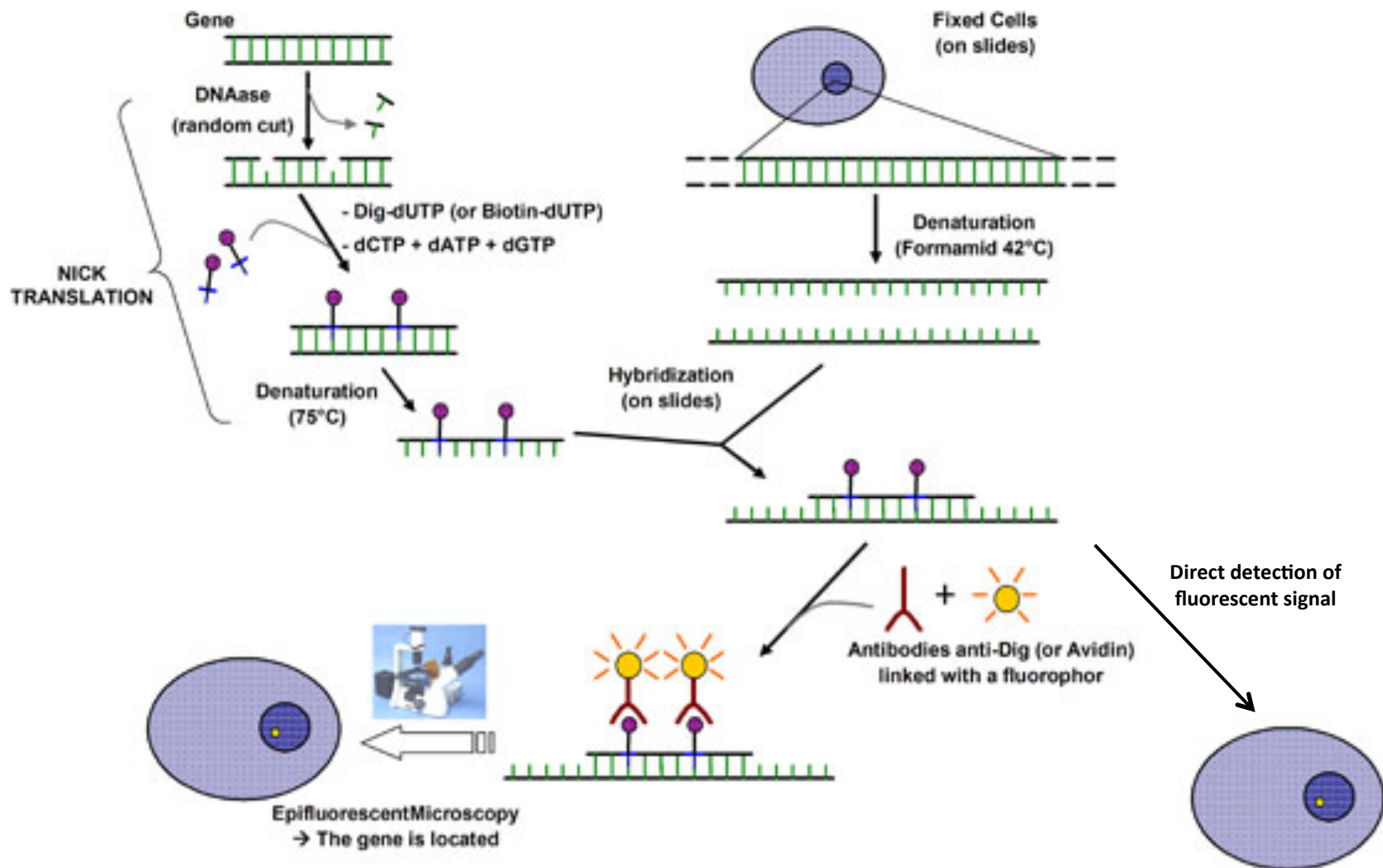
# Hybridation Moléculaire d'ADN, Rappels



## Principes de base de l'hybridation de l'ADN :

- Complémentarité
- Antiparallélisme

# Principe de la FISH



# Principe d'Utilisation de Sondes Fluorescentes

Fluorochromes (pour marquage des sondes) :

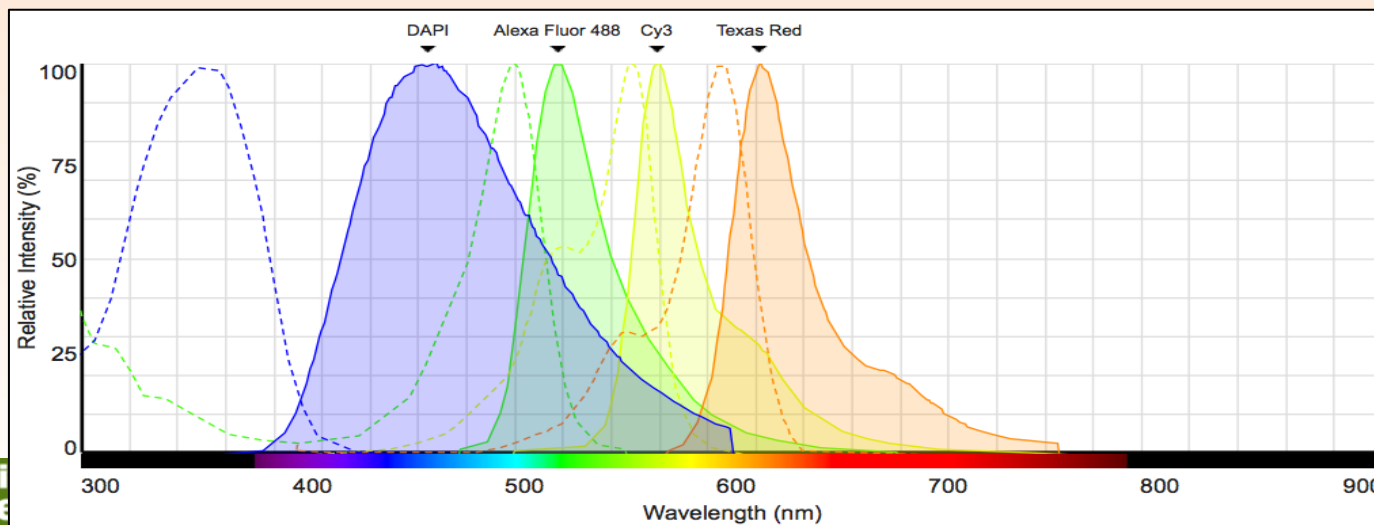
**FITC : vert**, correspond au filtre FITC

**Sp Orange : orange/rouge** : correspond au filtre Cy3

**TxRed = TRITC = : rouge (Rhodamine)** correspond au filtre Cy3,5

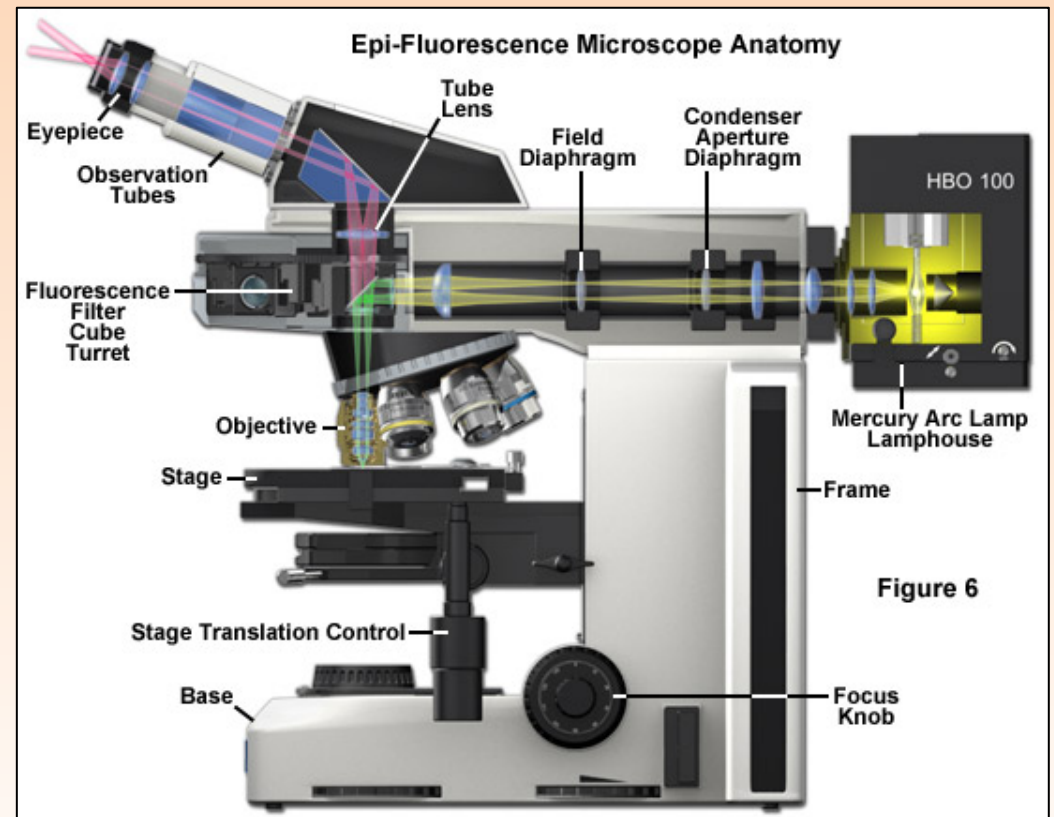
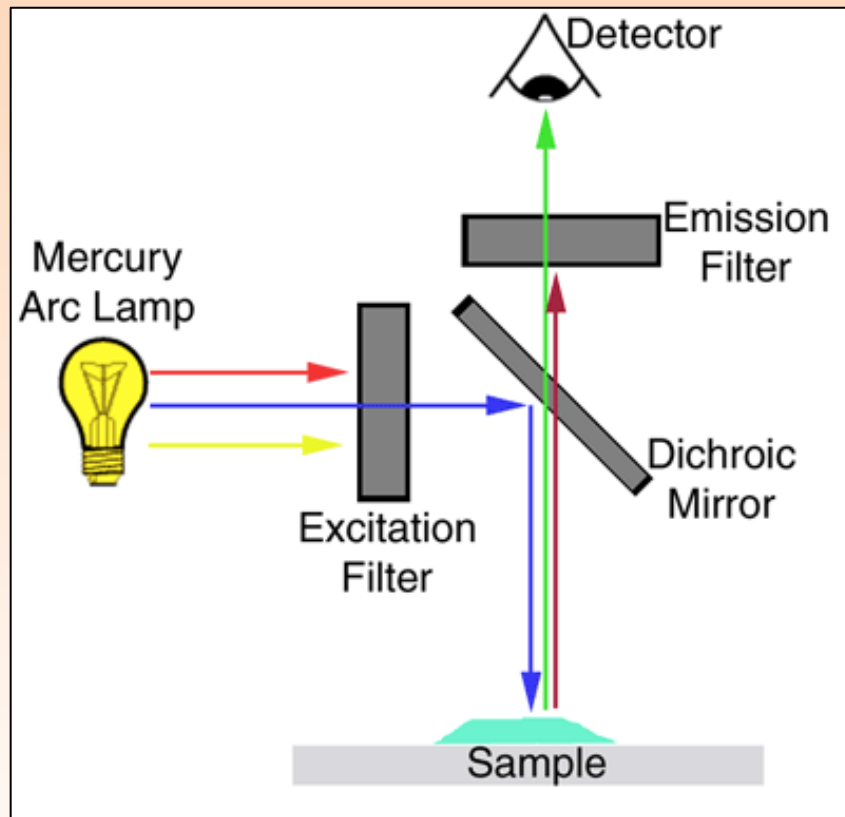
Chaque fluorochrome est détecté grâce à un couple spécifique de 2 filtres : 1 filtre d'excitation, 1 filtre d'émission.

**DAPI** : utilisé pour contre-colorer la préparation.



Chaque fluorochrome est détecté grâce à un **couple spécifique de 2 filtres** : 1 filtre d'excitation, 1 filtre d'émission.

# Principe de la Microscopie à Épifluorescence



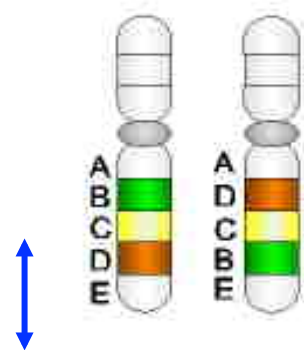


# Quelques Anomalies de Structure Chromosomique

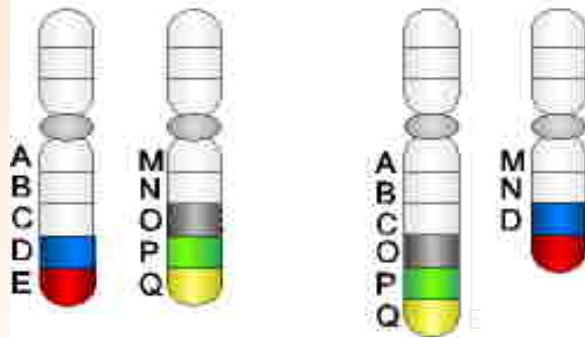
équilibrées

déséquilibrées

inversion



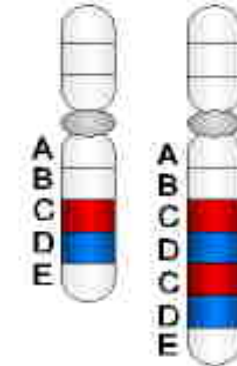
translocation  
réciproque



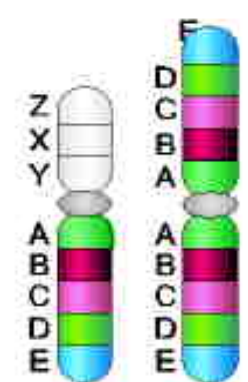
délétion



duplication

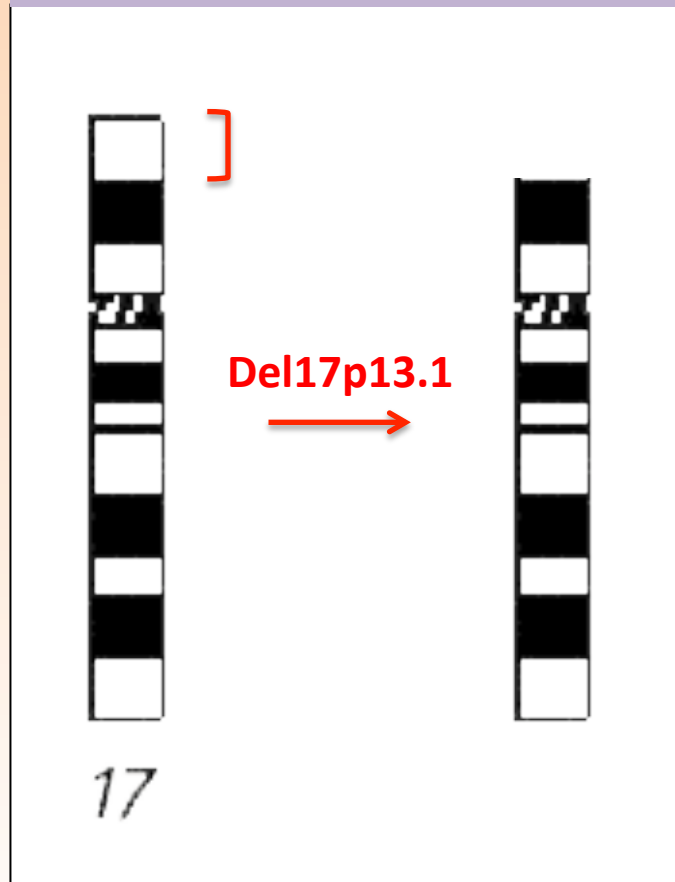


isochromosome

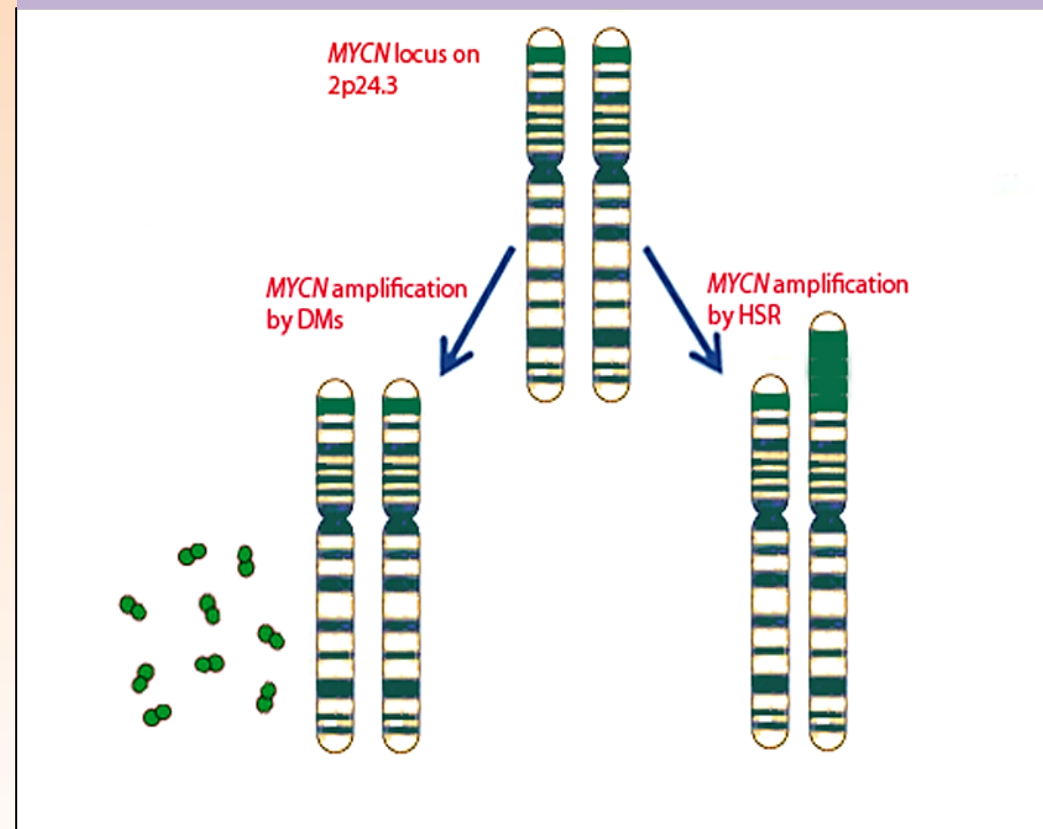


# Conséquences Possibles des Anomalies Chromosomiques

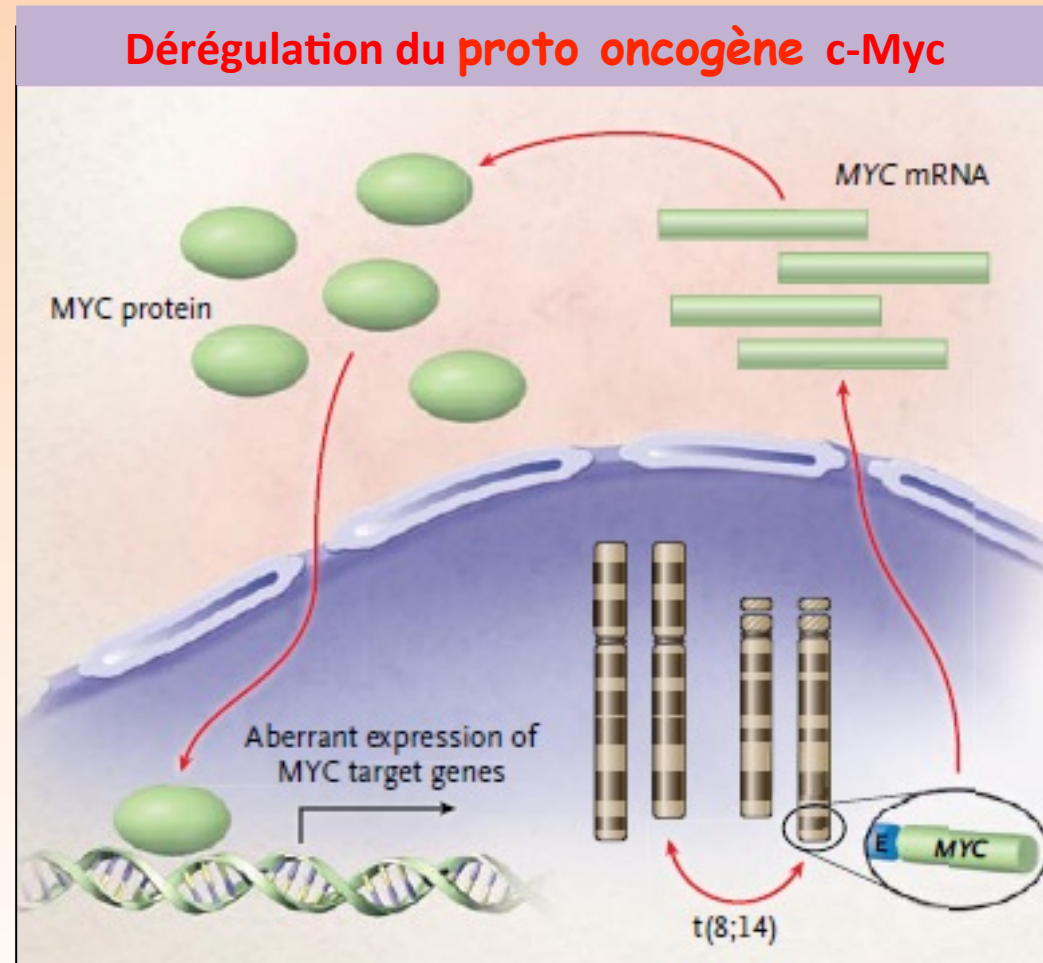
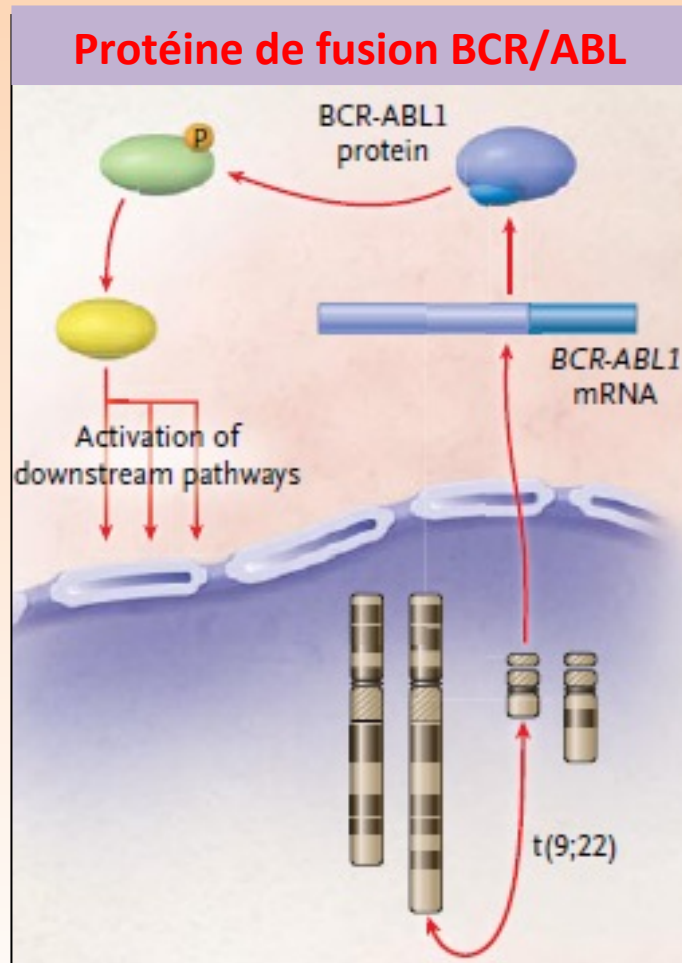
## Délétion de l'anti oncogène P53



## Amplification/Duplication du proto oncogène c-Myc

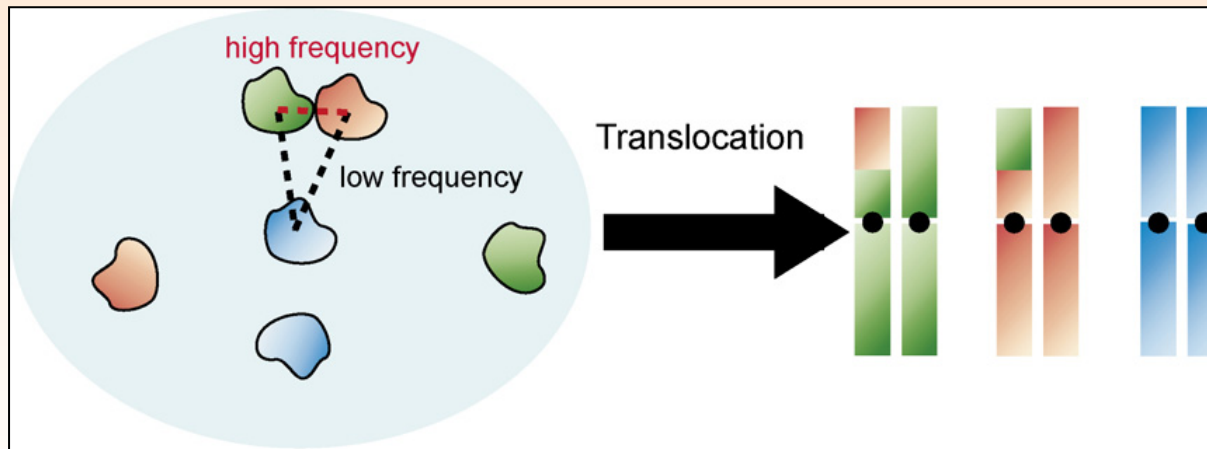
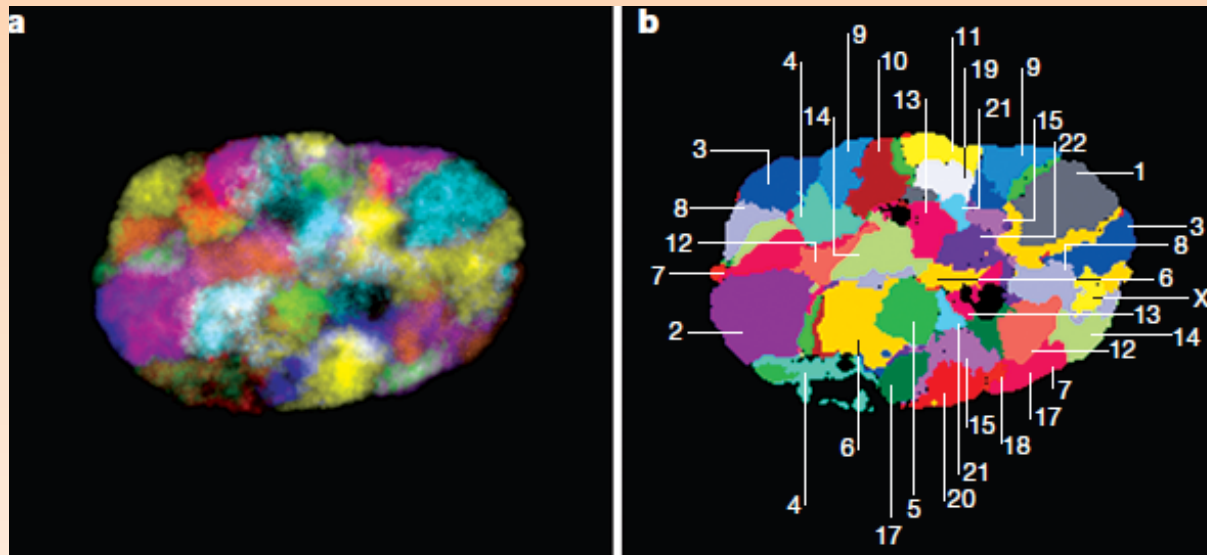


# Conséquences Possibles des Anomalies Chromosomiques



# Territoires Chromosomiques et Recombinaison

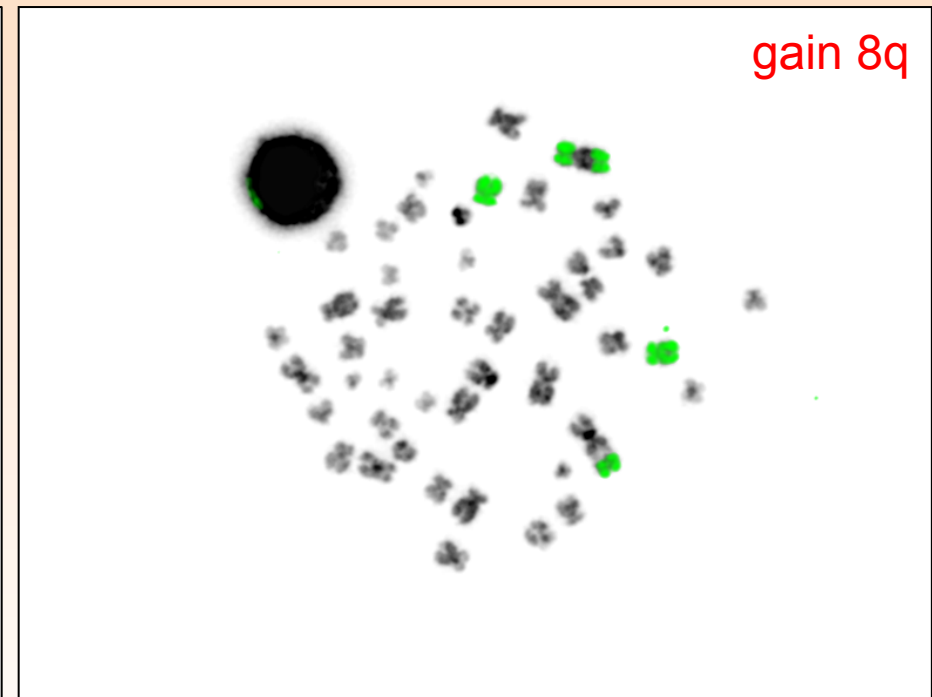
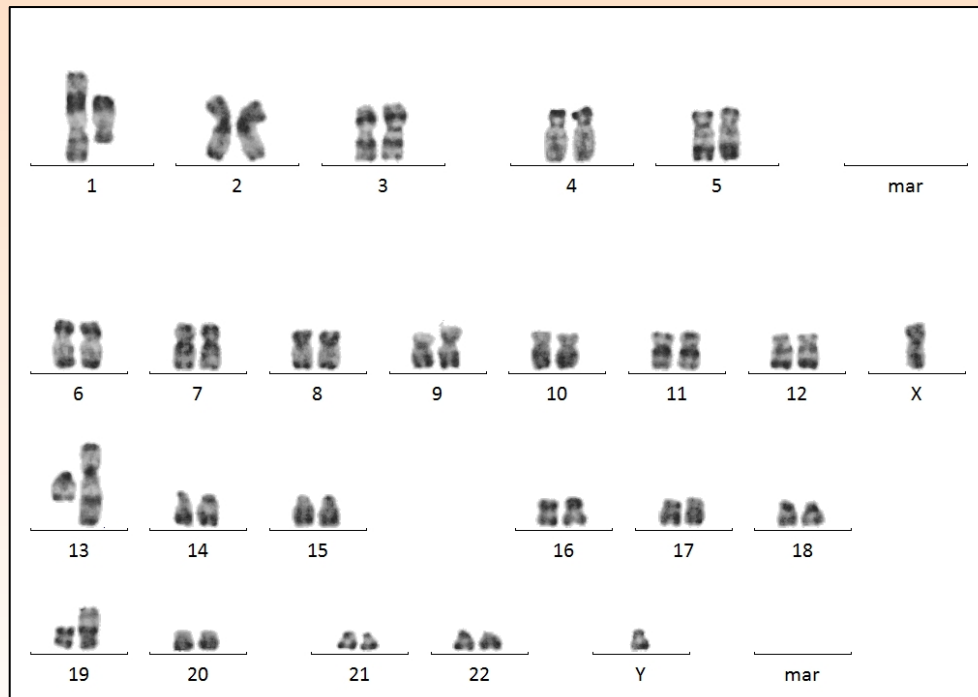
Nat. Rev. 2005



# Recherche d'un Remaniement du Chr8

## Sonde wcp8 (whole chromosome painting)

-> S'utilise pour voir des remaniements importants ou mal définis

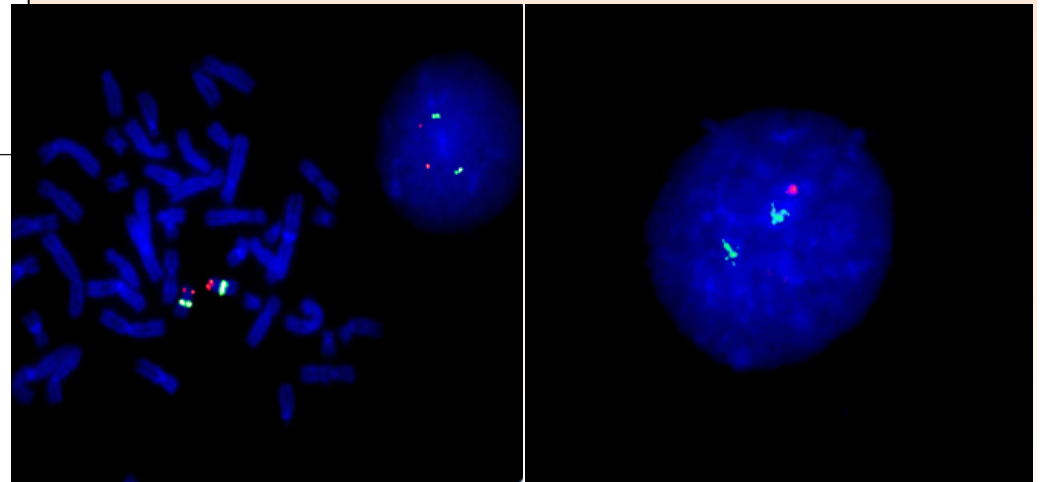
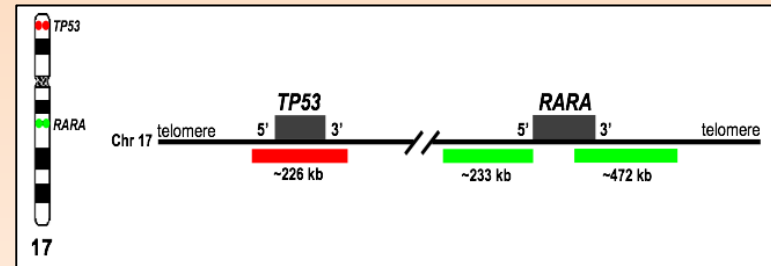
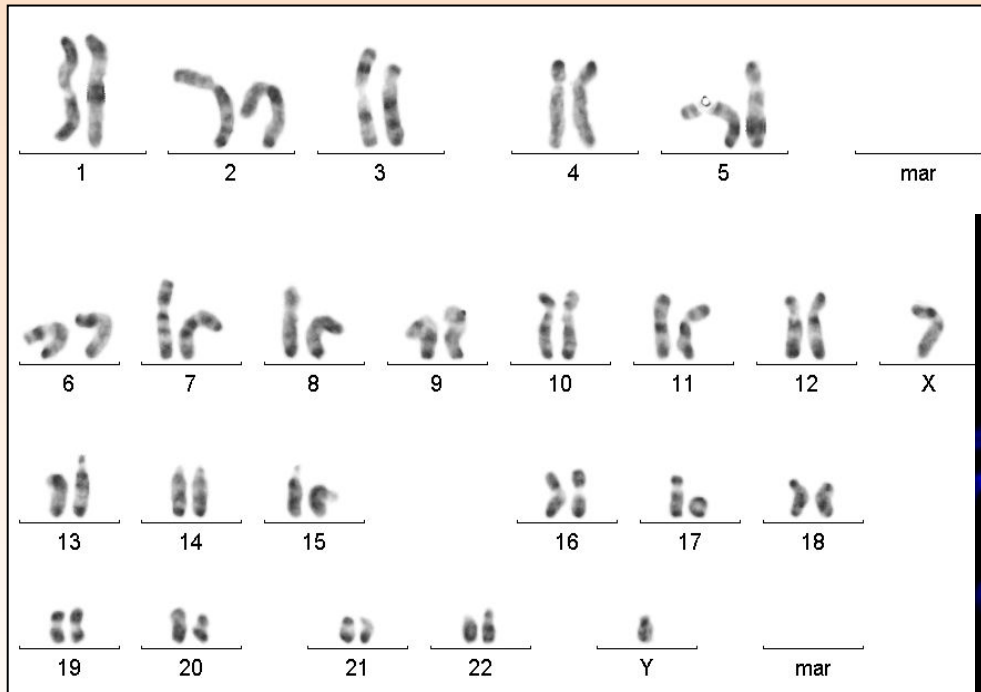


C. Lefebvre – IBP Grenoble

# Suspicion d'une Déletion de P53

## Sonde délétion

-> S'utilise toujours avec une sonde « contrôle » hybridant le même chromosome

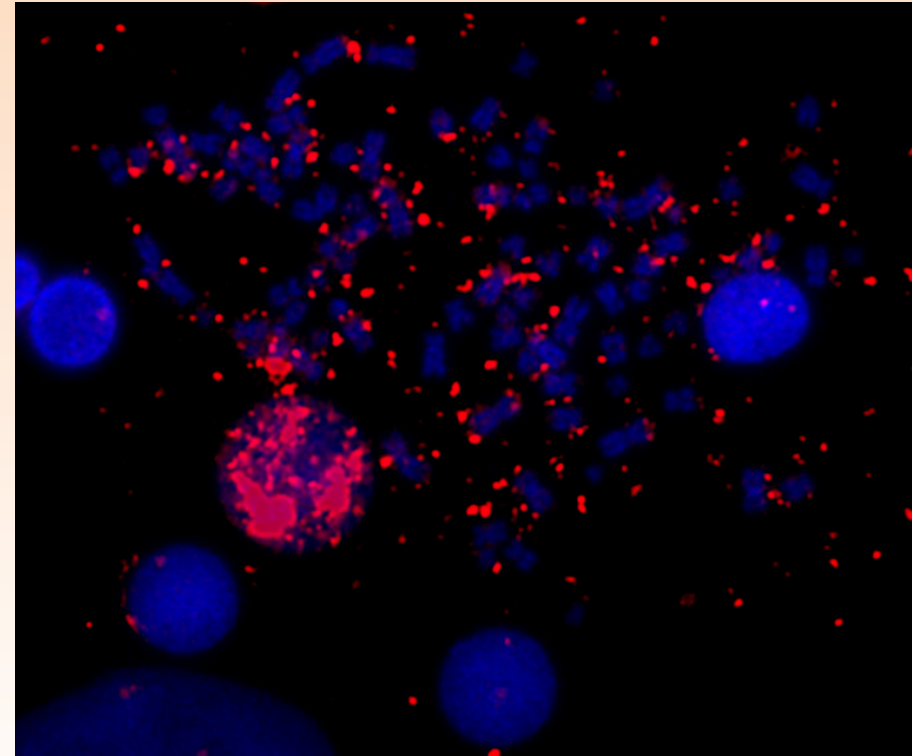
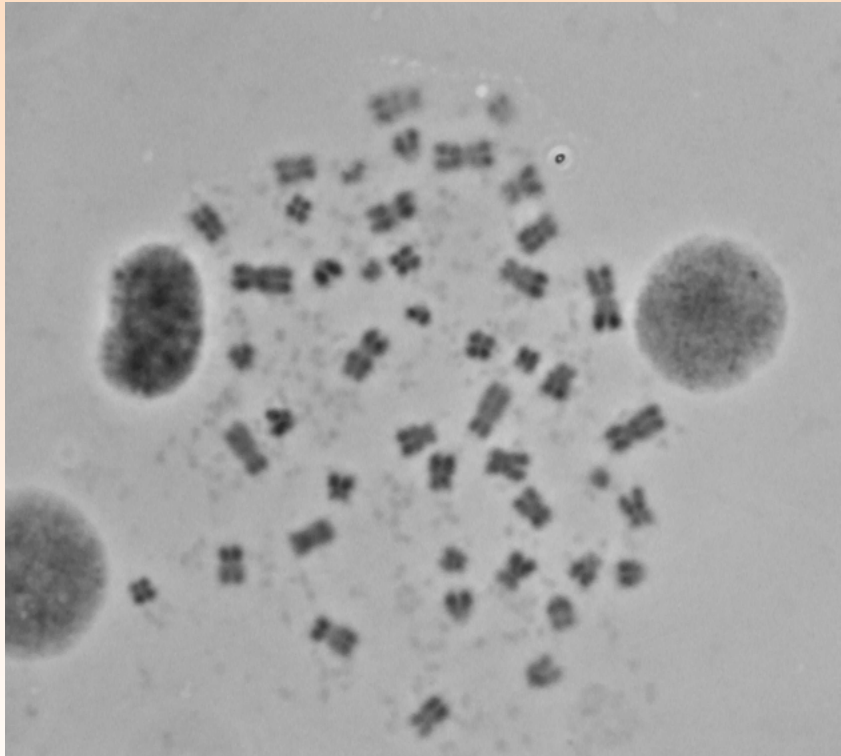




# Suspicion d'Amplification du gène *MYCN*

## Sonde gain/amplification

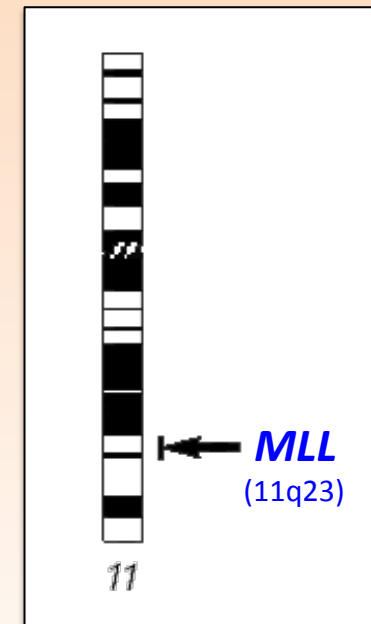
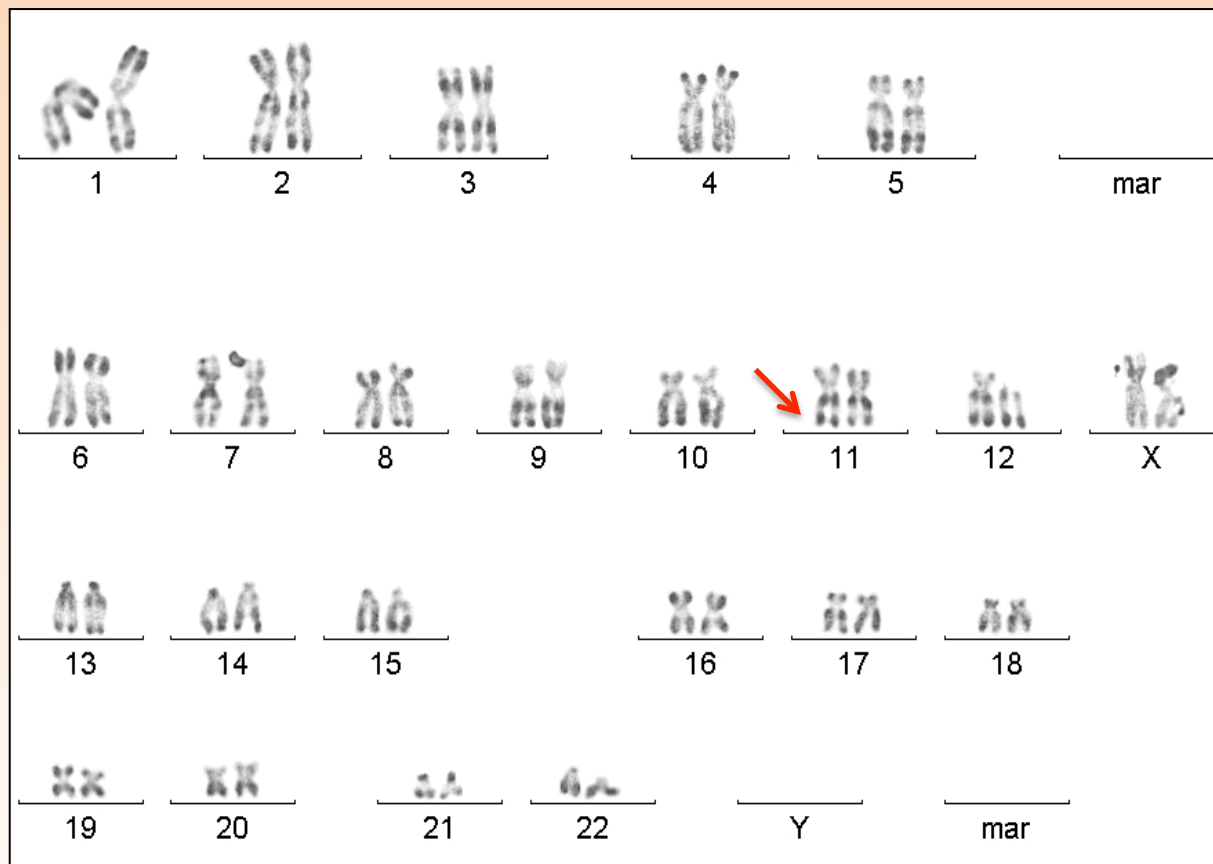
-> S'utilise souvent avec une sonde « contrôle » hybridant le même chromosome



C. Lefebvre – IBP Grenoble

# Doute sur le Remaniement d'un Gène Connu

Suspicion de remaniement dans la région 11q (héberge le gène *MLL*, *Mixed-Lineage Leukemia*)



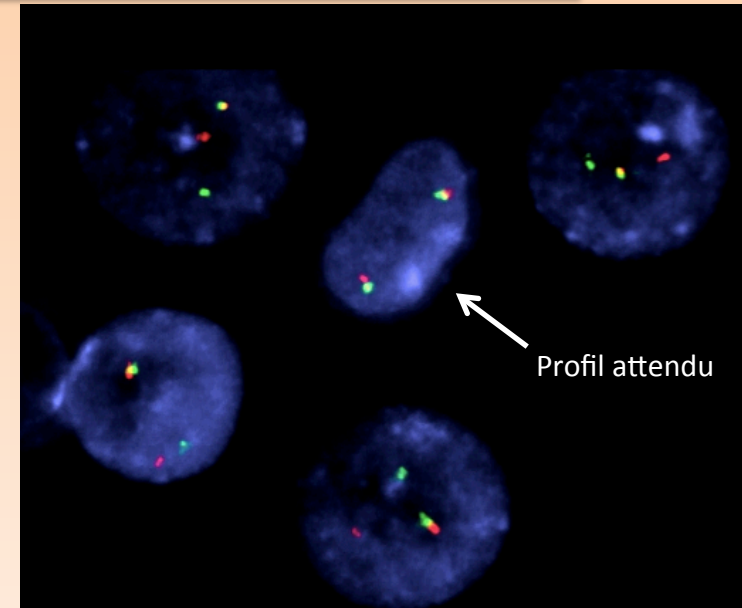
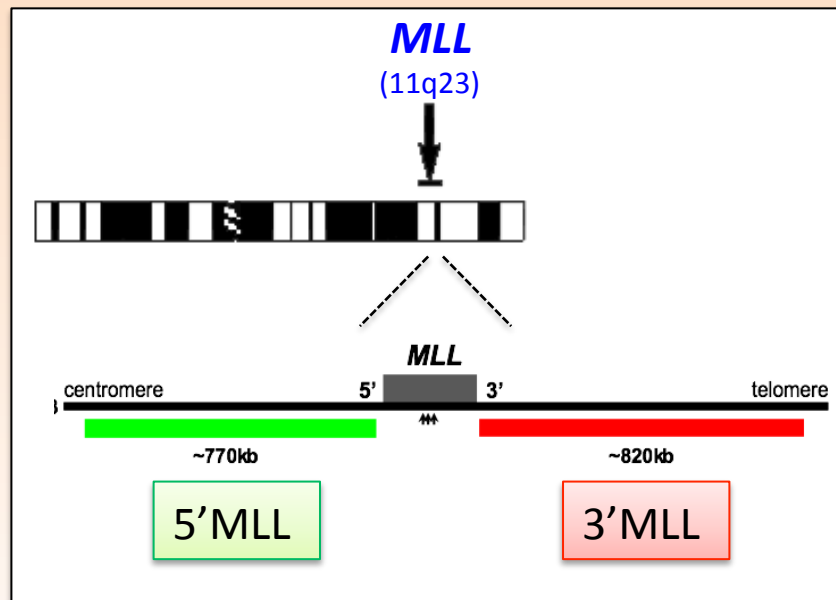
C. Lefebvre – IBP Grenoble



# Doute sur le Remaniement du Gène *MLL*

## Sondes breakapart (split signal ; séparation)

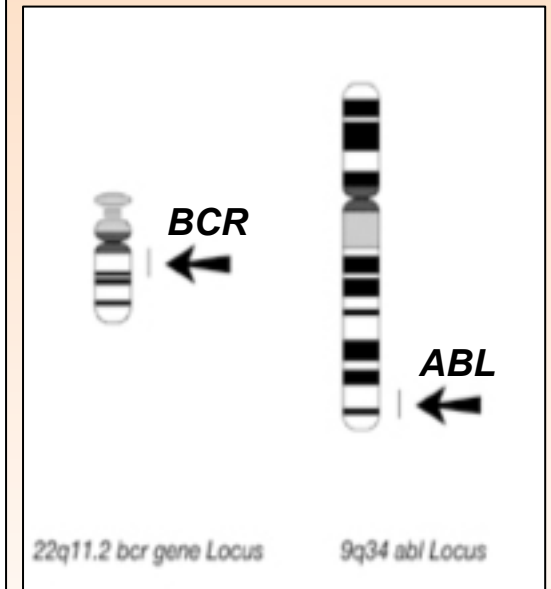
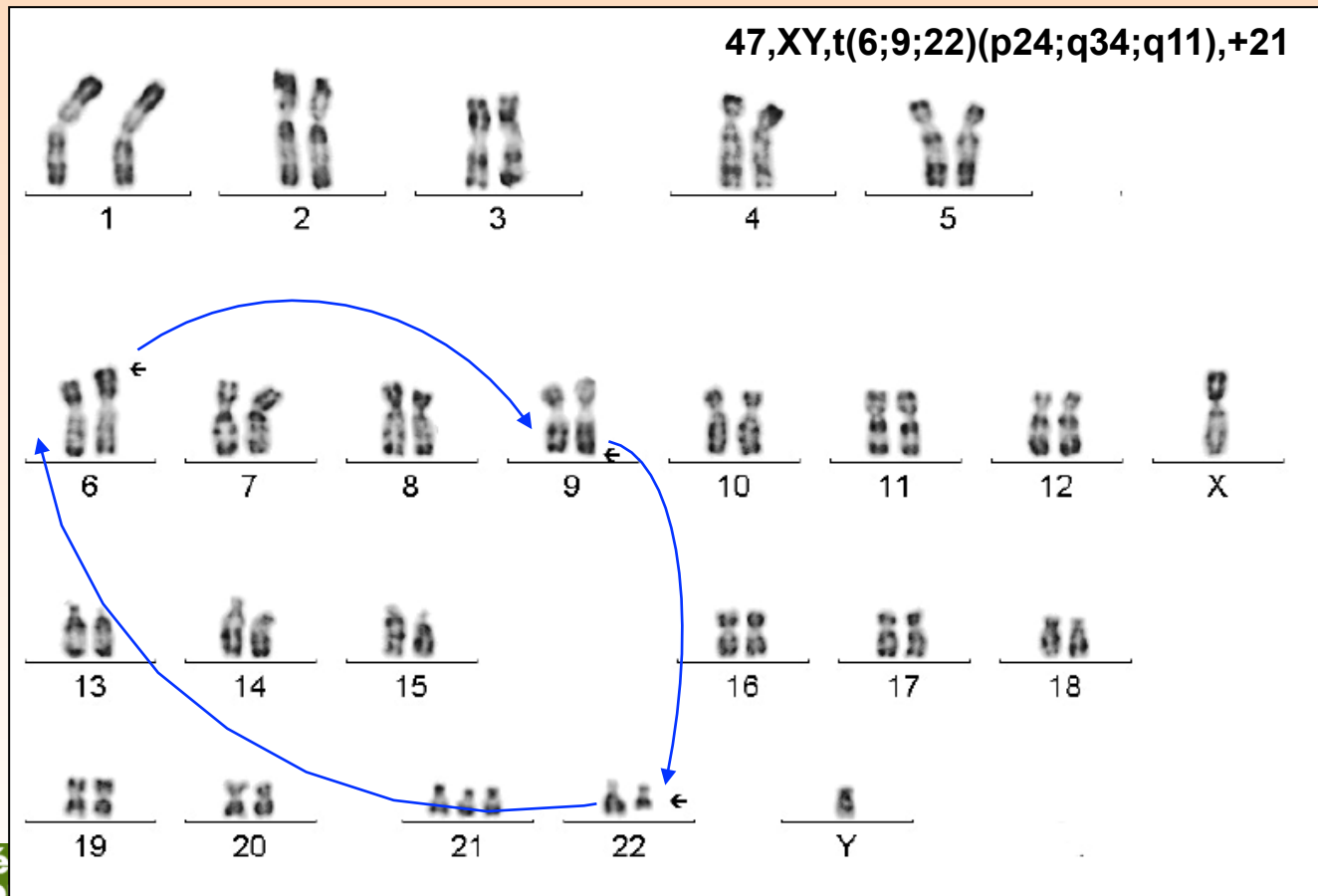
-> Consiste en l'utilisation de **2 sondes** contigües (ou presque) hybridant la même région



C. Lefebvre – IBP Grenoble

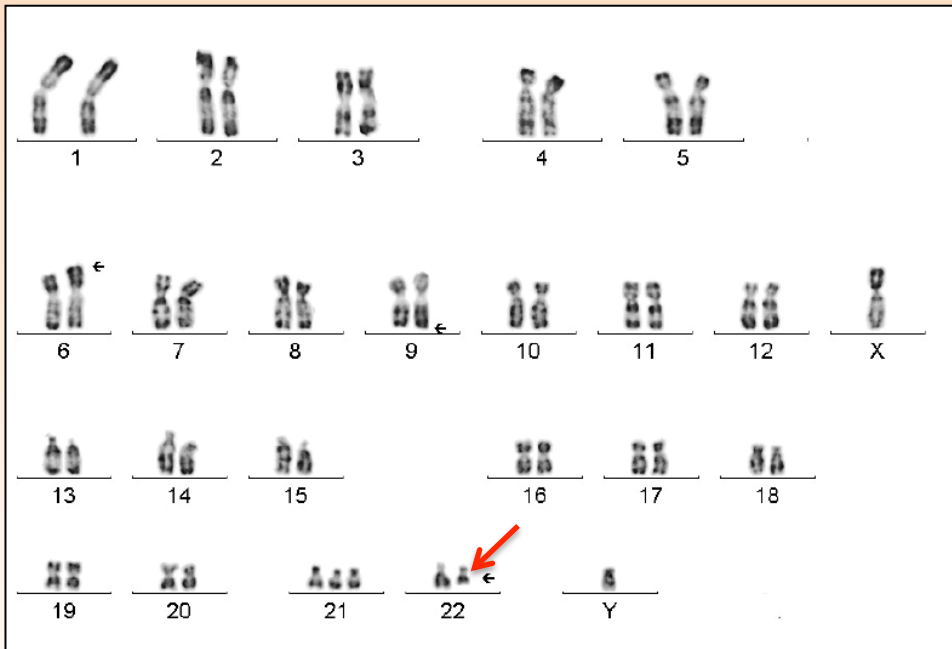
# Doute sur le Remaniement Entre 2 Gènes Connus

Suspicion de translocations multiples entre les chr 6, 9 et 22  
(chr.9 héberge le gène *ABL*, chr.22 héberge le gène *BCR*)

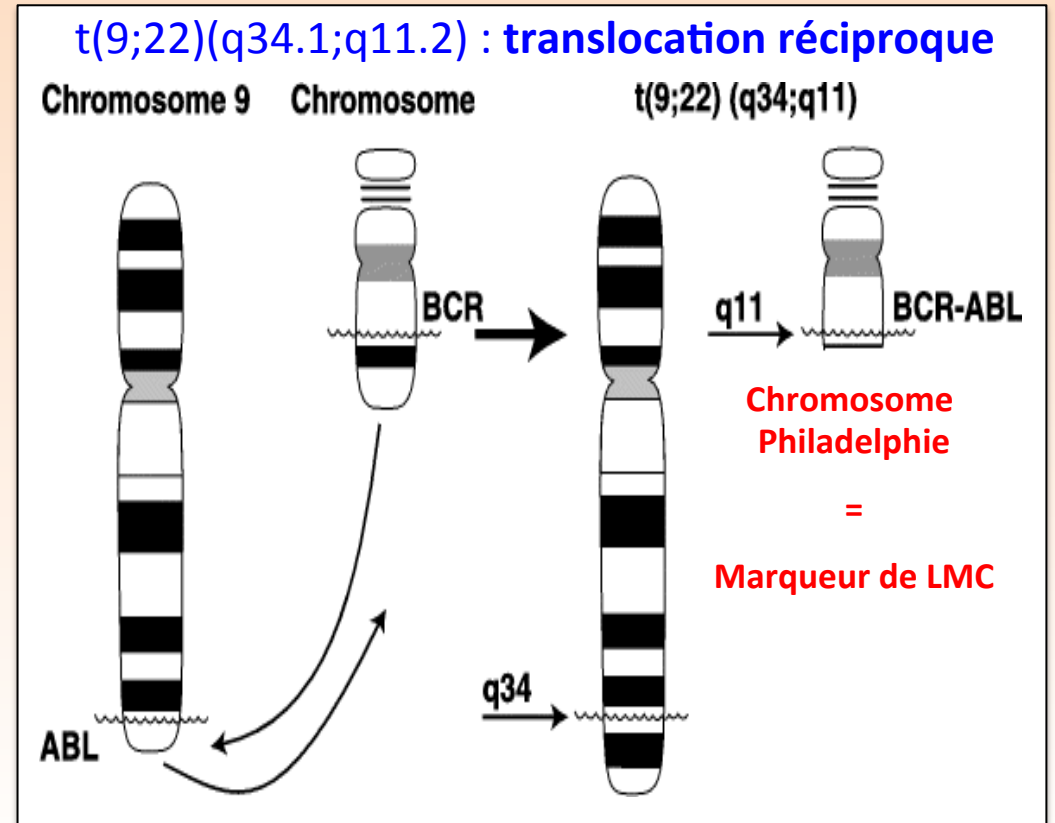


# Réarrangement Entre les Gènes *ABL* et *BCR*

Translocations  $t(9;22)(q34.1;q11.2)$  et **Chromosome Philadelphie**



C. Lefebvre – IBP Grenoble

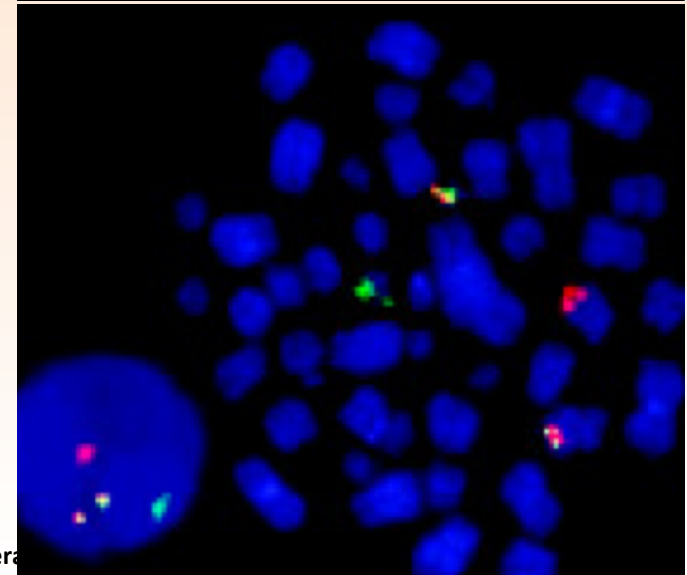
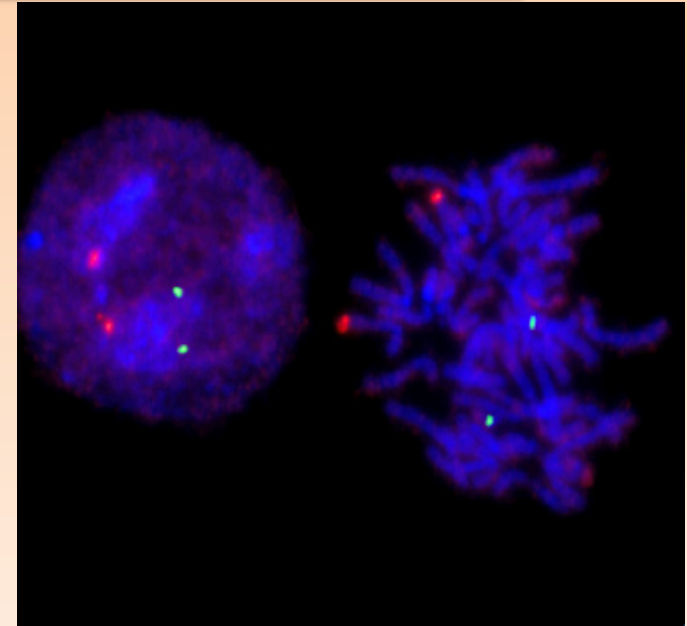
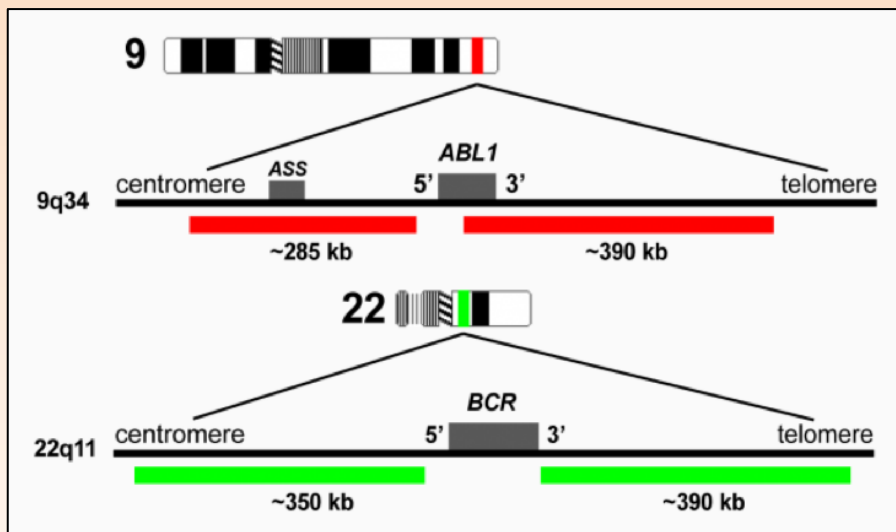


Daniel Perazza – Formation Génét. Humaine & Diagnostique – Bio. Cell. Mars 2015

# Doute sur le Réarrangement entre les Gènes *ABL* et *BCR*

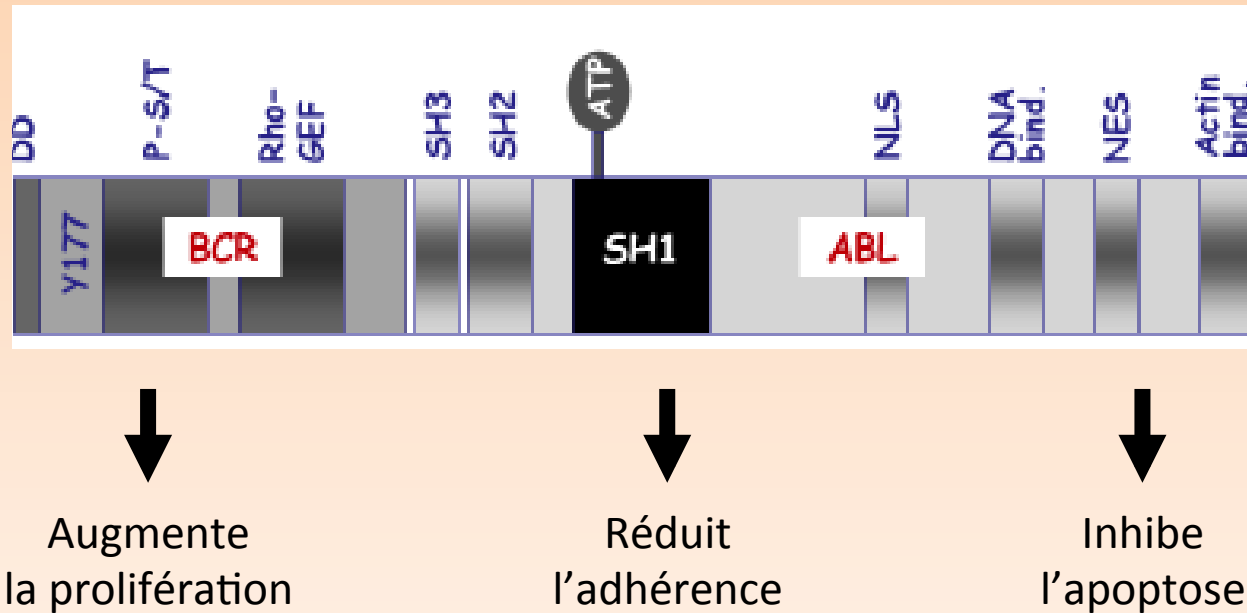
## Sondes fusion (split signal ; séparation)

-> Consiste en l'utilisation de **2 sondes** hybridant les régions suspectées de fusion



[www.cancergeneticsitalia.com](http://www.cancergeneticsitalia.com)

# Effet de la Protéine de Fusion BCR/ABL

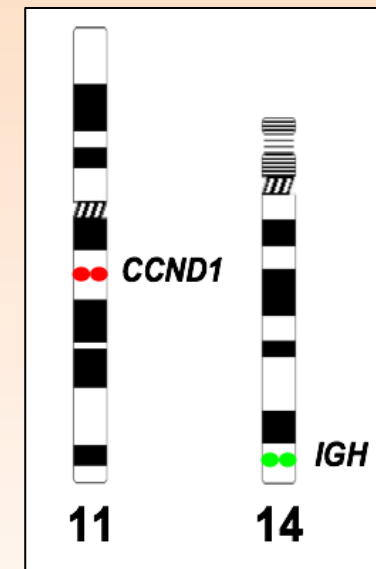
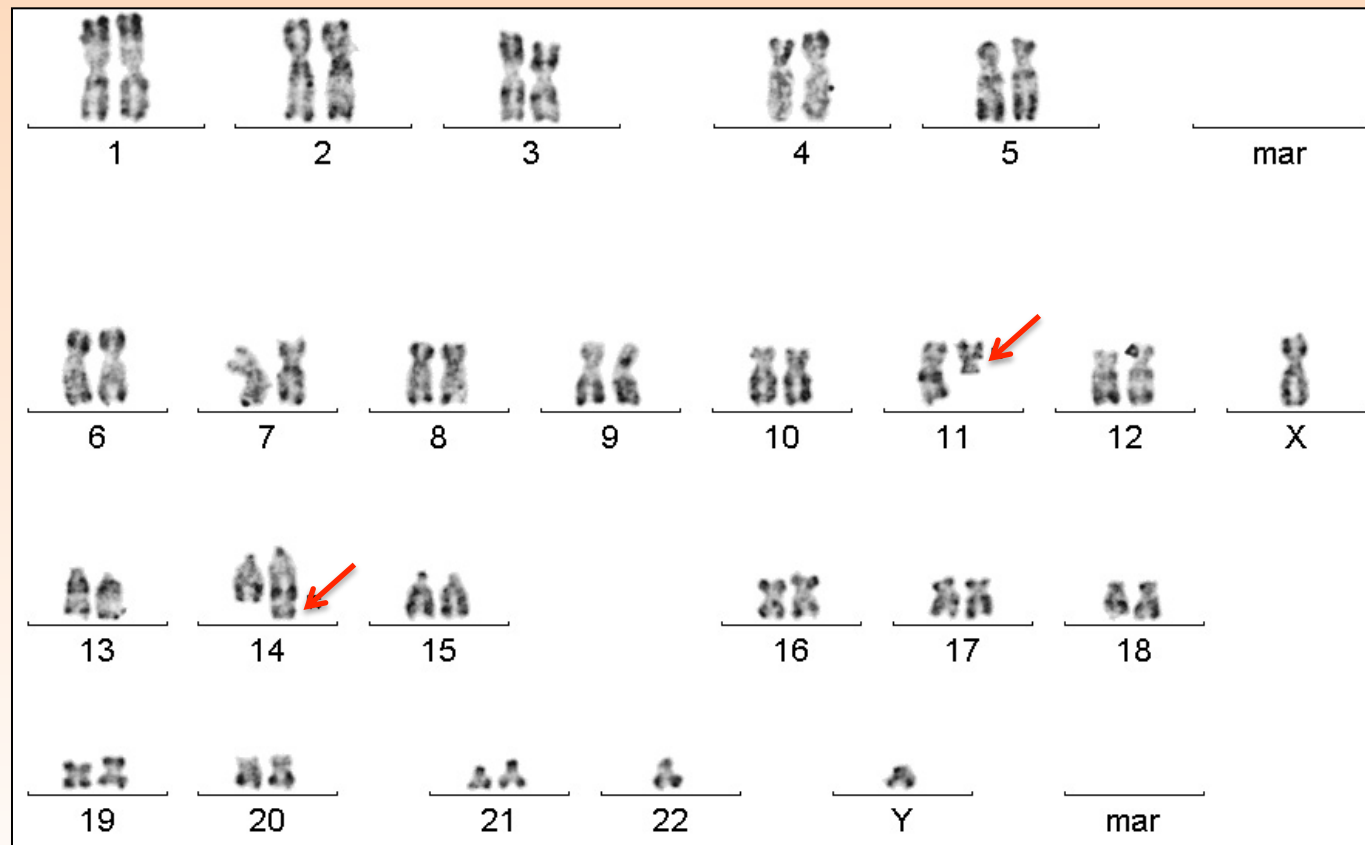


-> Induit une forte instabilité génétique

**Question : comment vérifier la fusion réelle entre 2 protéines ?**

# Autre Remaniement Entre 2 Régions connues

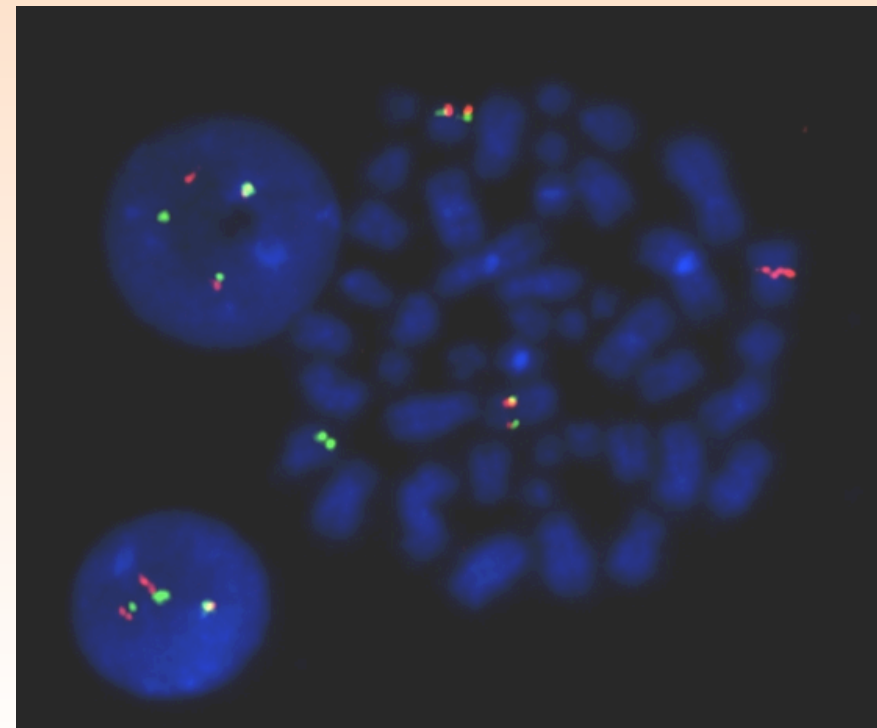
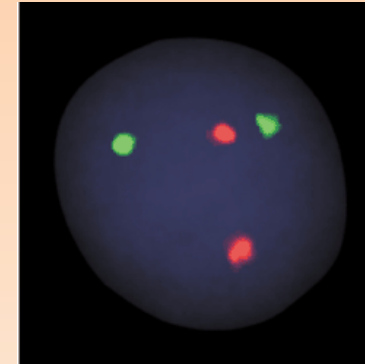
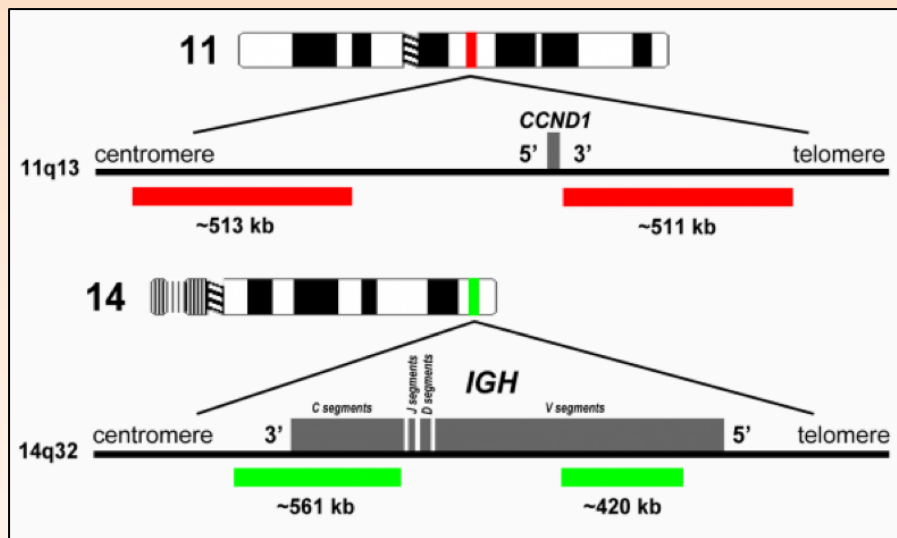
Translocations  $t(11;14)(q13;q32)$  et sur-expression de la cycline D1



# Doute sur le Réarrangement Entre les Gènes *IGH* et *CCND1*

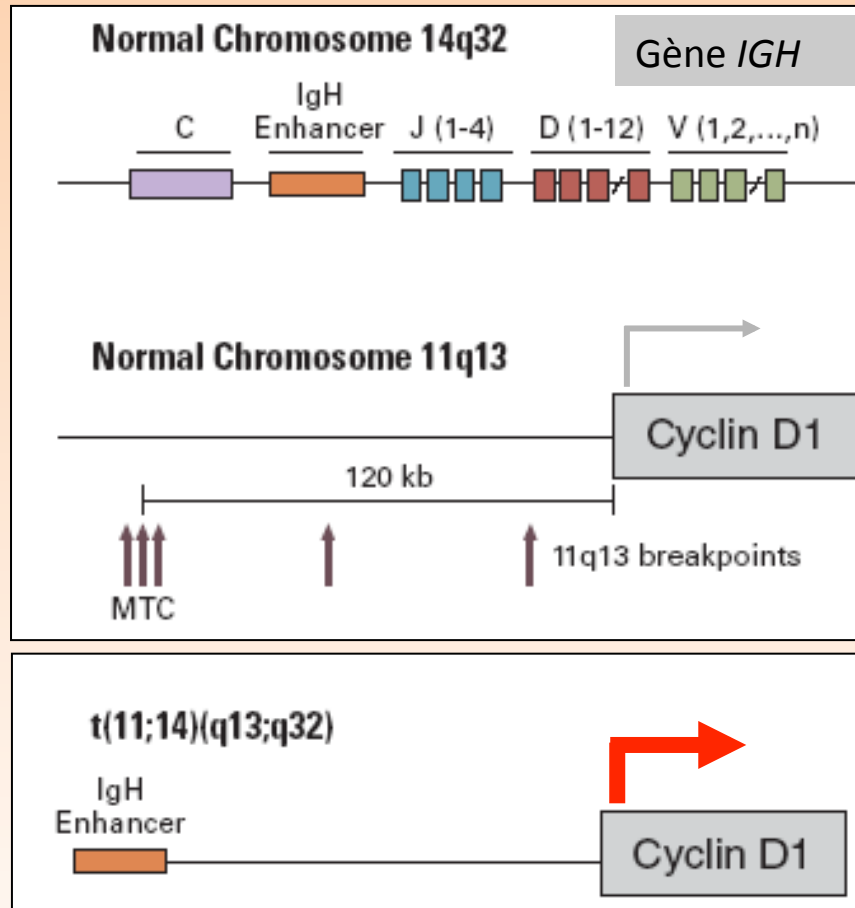
## Sondes fusion (split signal ; séparation)

-> Consiste en l'utilisation de **2 sondes** hybridant les régions suspectées de fusion



C. Lefebvre – IBP Grenoble

# Effet du Réarrangement Entre les Gènes *IGH* et *CCND1*



**Cassures IGH :**  
entre les segments D et J

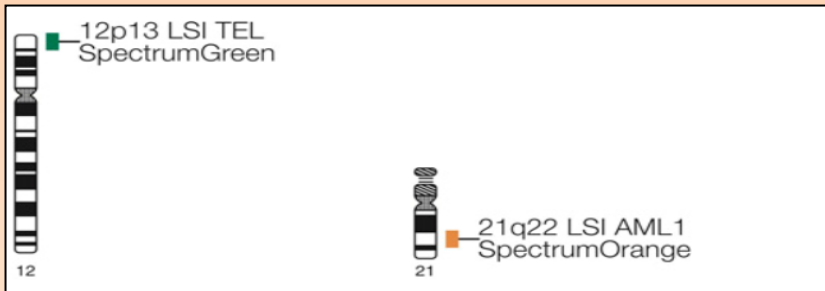
**Cassures 11q13 :**  
hot spot : MTC 120kb en 5' de *CCND1*

**Surexpression de la  
cycline D1**

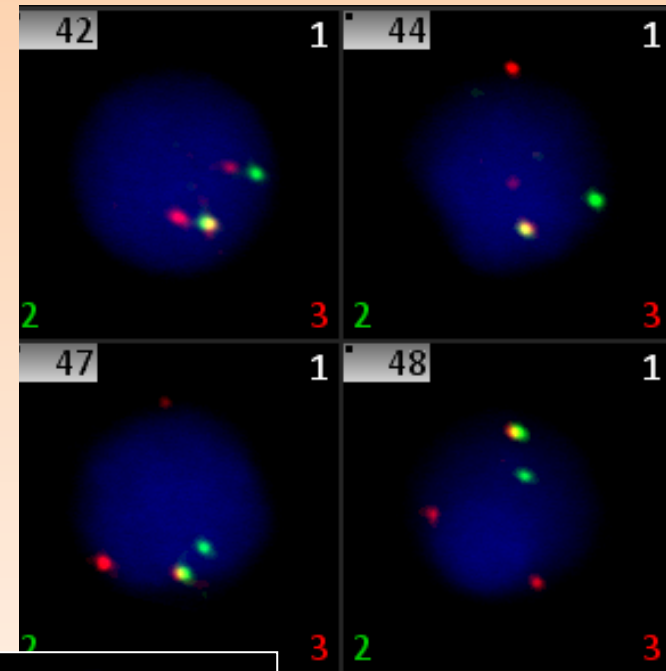
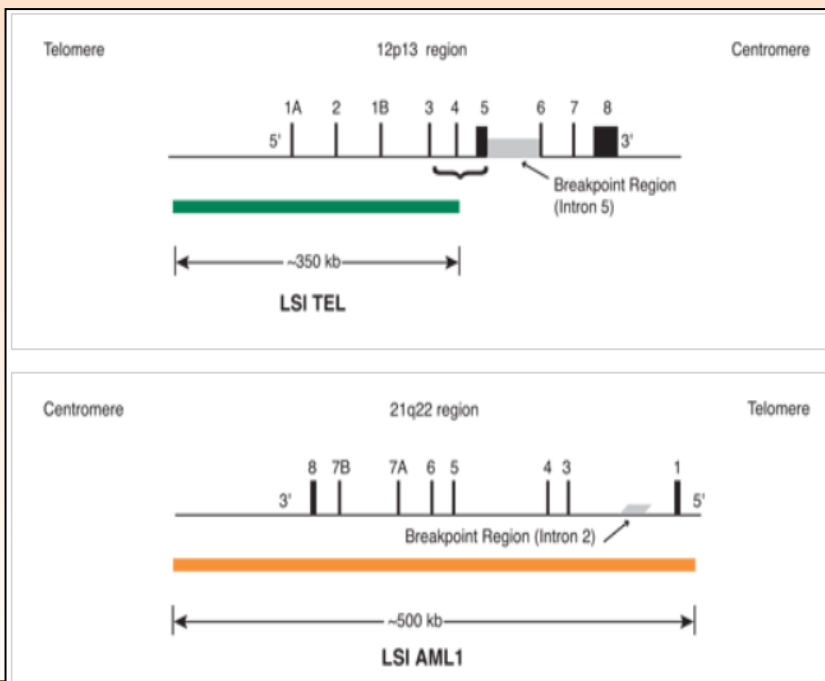
**Question : comment vérifier la surexpression de *CCND1* ?**



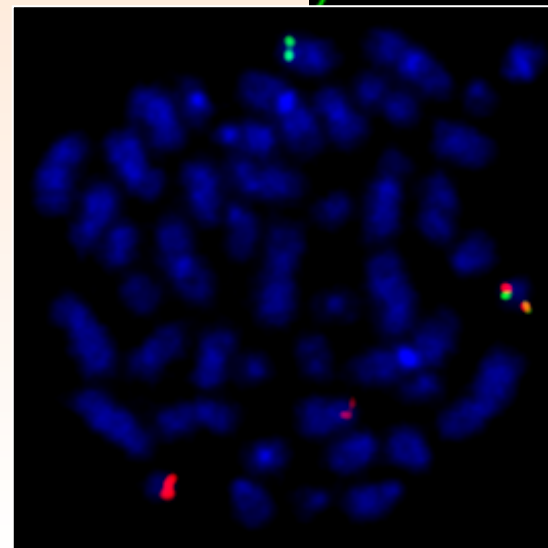
# Remaniement avec Amplification de Signal



## Sonde fusion avec extra-signal



C. Lefebvre – IBP Grenoble



**Translocation**  $t(12;21)$  TEL/  
AML1 accompagnée d'une  
**duplication** du gène *AML1*

# Intérêts & Limites de la FISH

---

---

**Analyse simple et rapide**

**Information plus précise et détaillée qu'un caryotype**

**Identification de nouveaux remaniements nécessite de nouvelles sondes**

**Fusion entre gènes à confirmer par biologie moléculaire (séquençage, RT-PCR)**