

La chirurgie du gène : un nouvel espoir thérapeutique

Sylvie FANFANO

- Pour appréhender la chirurgie du gène comme méthode possible de thérapie de maladies génétiques, nous allons travailler sur une maladie génétique connue de tous : la myopathie.
- Dans un 1^o temps nous présenterons 2 myopathies contrastées en précisant les symptômes et les organes concernés.
- Nous aborderons ensuite la biologie moléculaire par la protéine impliquée et son gène.

Plan :

I –Deux myopathies contrastées :

DMD(**Duchenne) et BMD (**Becker**) :**

Symptômes et organes concernés

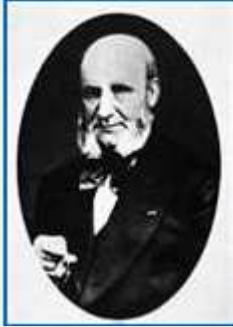
La molécule : la dystrophine

II - Biologie moléculaire du gène de la dystrophine

Plan :

III – L'origine génétique des dystrophinopathies:

IV - Une thérapie d'espoir : la chirurgie du gène



Myopathie de Duchenne



- Elle doit son nom à **Guillaume Duchenne**, qui en fit la description en 1858. Guillaume Duchenne, médecin neurologue français, était originaire de **Boulogne** sur mer et il est aussi nommé Duchenne de Boulogne. Il fût le fondateur de la neurologie.
- La dystrophie musculaire de Duchenne est **la plus répandue des myopathies de l'enfant** : elle concerne **1 garçon sur 3 500** à la naissance.
- C'est une maladie qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles **squelettiques**, muscle **cardiaque** et muscles **lisses**) mais aussi d'autres organes.

La maladie correspond à une **dégénérescence progressive** des cellules musculaires.

Les myocytes sont **au début régénérées** et la maladie de Duchenne est **silencieuse** dans les premières années de la vie car l'organisme remplace les cellules musculaires perdues. Les muscles sont donc fonctionnels et la vie du nourrisson normale.

Mais le mécanisme de régénération finit par **ne plus fonctionner**. Les fibres musculaires détruites sont ensuite remplacées par **du tissu adipeux et du tissu conjonctif**, ce qui provoque, à l'âge de deux ou trois ans, les premiers signes visibles de la maladie : la perte de fonctionnalité du muscle.

- Le signe évocateur le plus **précocement** observé est la **pseudo-hypertrophie des muscles des mollets**, qui correspond à leur infiltration par des tissus fibro-adipeux. La faiblesse musculaire touche préférentiellement les muscles des membres inférieurs avant d'atteindre ceux des membres supérieurs.

La maladie est donc progressive et d'évolution fatale car elle aboutit à la **paralysie de muscles vitaux**, tels que les muscles cardiaque et respiratoires.

- L'âge moyen **d'apparition des symptômes se situe à 2,5 ans**, alors que l'âge du **diagnostic final est en moyenne à 5 ans**. Le **retard moteur de la marche** et les **troubles du langage** sont les **premiers signes**, avec le plus souvent des difficultés à marcher, une faiblesse musculaire.
- L'atteinte des **muscles lisses** est à l'origine de nombreux **symptômes digestifs**, tels que le reflux gastro-oesophagien la constipation, l'incontinence anale, ou les troubles de la vidange gastrique. Ces troubles sont dus à la fragilisation des muscles lisses.

- **Des troubles cognitifs :**

Depuis la découverte de la maladie par Duchenne jusqu'aux années 1970, le déficit cognitif n'était pas considéré comme faisant partie de la maladie.

Il a été établi depuis que les patients DMD peuvent présenter un **déficit cognitif non-progressif**.

Environ **30% des patients présentent un retard mental**. En plus du déficit intellectuel, les patients montrent un profil cognitif spécifique, avec des **difficultés pour la mémorisation des chiffres** ou pour la **compréhension du langage verbal**.

Il existe des degrés de sévérité variables.

- **Des troubles de la vision** par perturbation de la transmission rétinienne et des **troubles de l'audition** sont fréquemment rencontrés chez les patients.

- **La myopathie de Becker (= BMD) : cette forme moins sévère de dystrophinopathie a été rapportée en 1955 par Becker.**

La dystrophie musculaire de Becker est **dix fois moins fréquente** que la dystrophie musculaire de Duchenne.

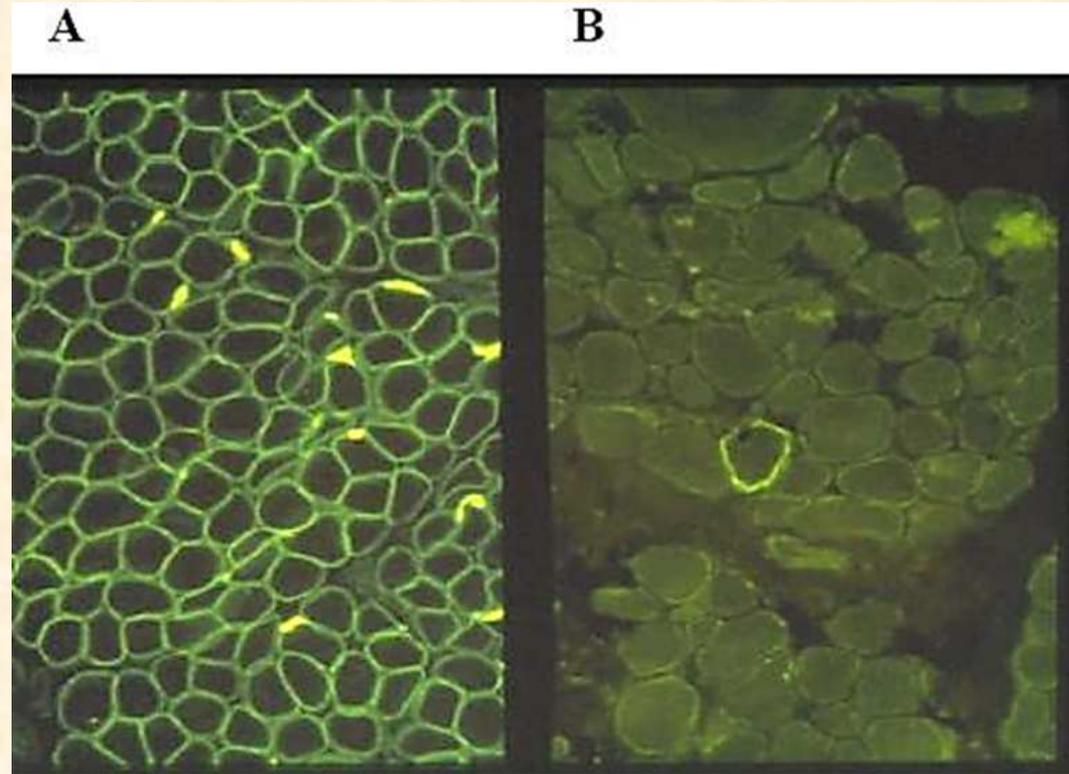
Ses **manifestations** sont **moins marquées** et **moins évolutives** que celles de la dystrophie musculaire de Duchenne.

La dystrophie musculaire de Becker est caractérisée par **un grand polymorphisme clinique, l'incapacité locomotrice** pouvant survenir **tôt dans l'adolescence ou ne jamais se manifester**, parfois les seuls signes cliniques sont des **crampes et douleurs musculaires**.

Il existe même des formes particulièrement peu sévères de BMD, à révélation tardive : des troubles de la marche apparus **après l'âge de 60 ans**.

- Une protéine est impliquée : la dystrophine et les maladies en rapport avec les anomalies de la dystrophine s'appellent des **dystrophinopathies**.

Marquage par immunofluorescence de la dystrophine

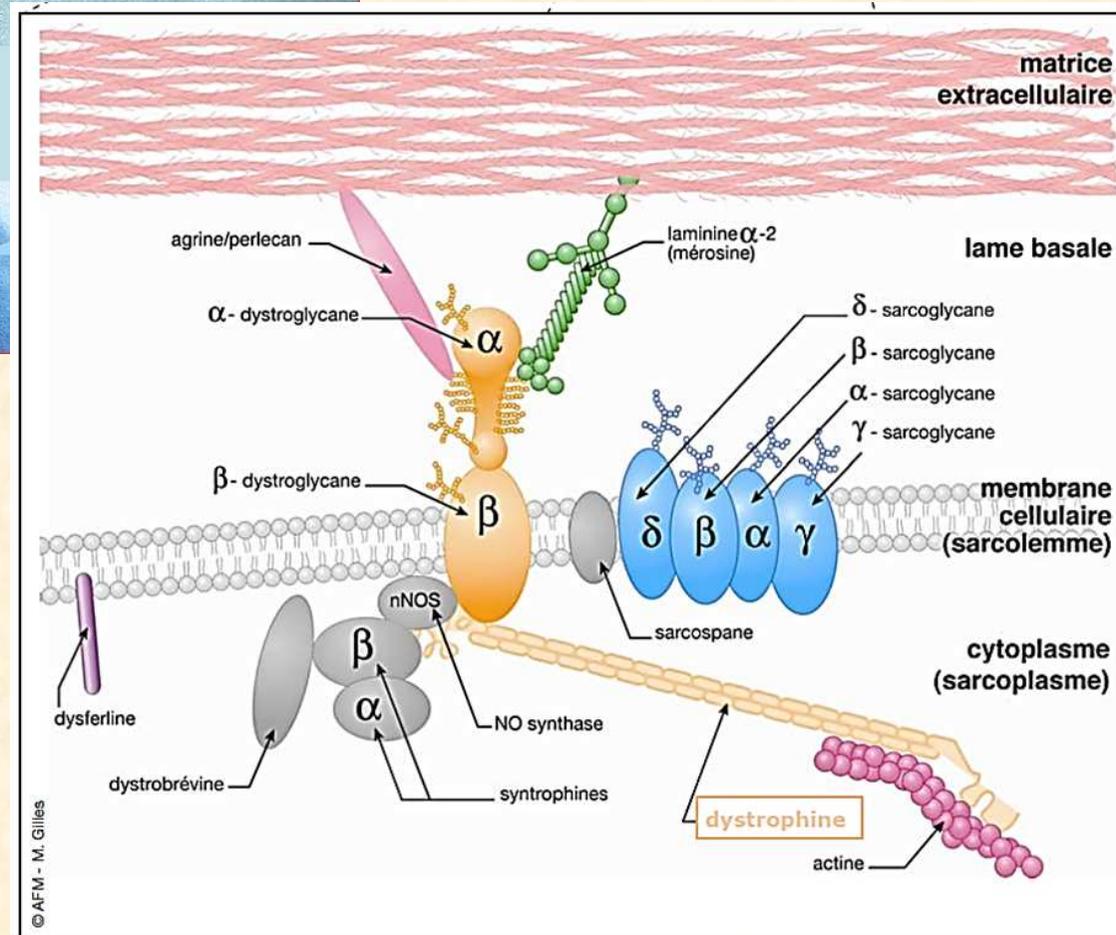
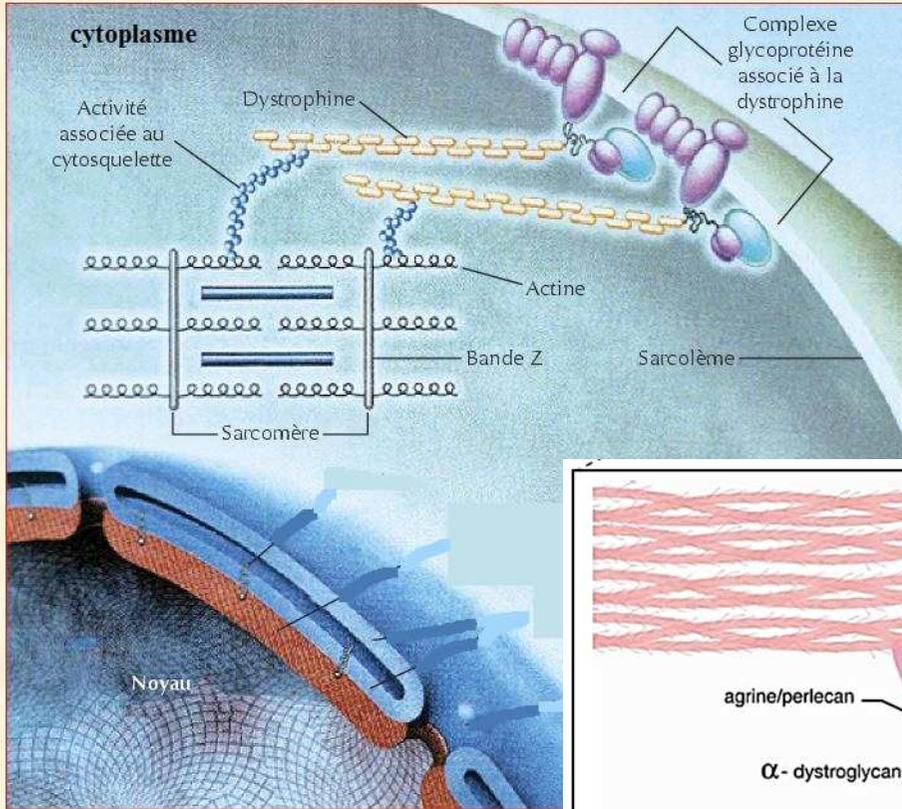


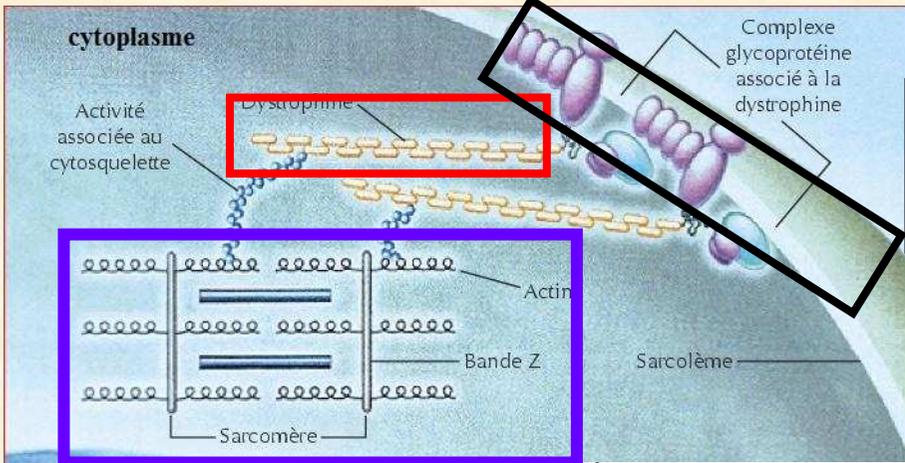
<http://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/BEN4685.pdf>

chez un sujet sain

**chez un sujet atteint
de myopathie de Duchenne**

La protéine impliquée est la dystrophine qui est présente en petite quantité et localisée sous la membrane cellulaire.

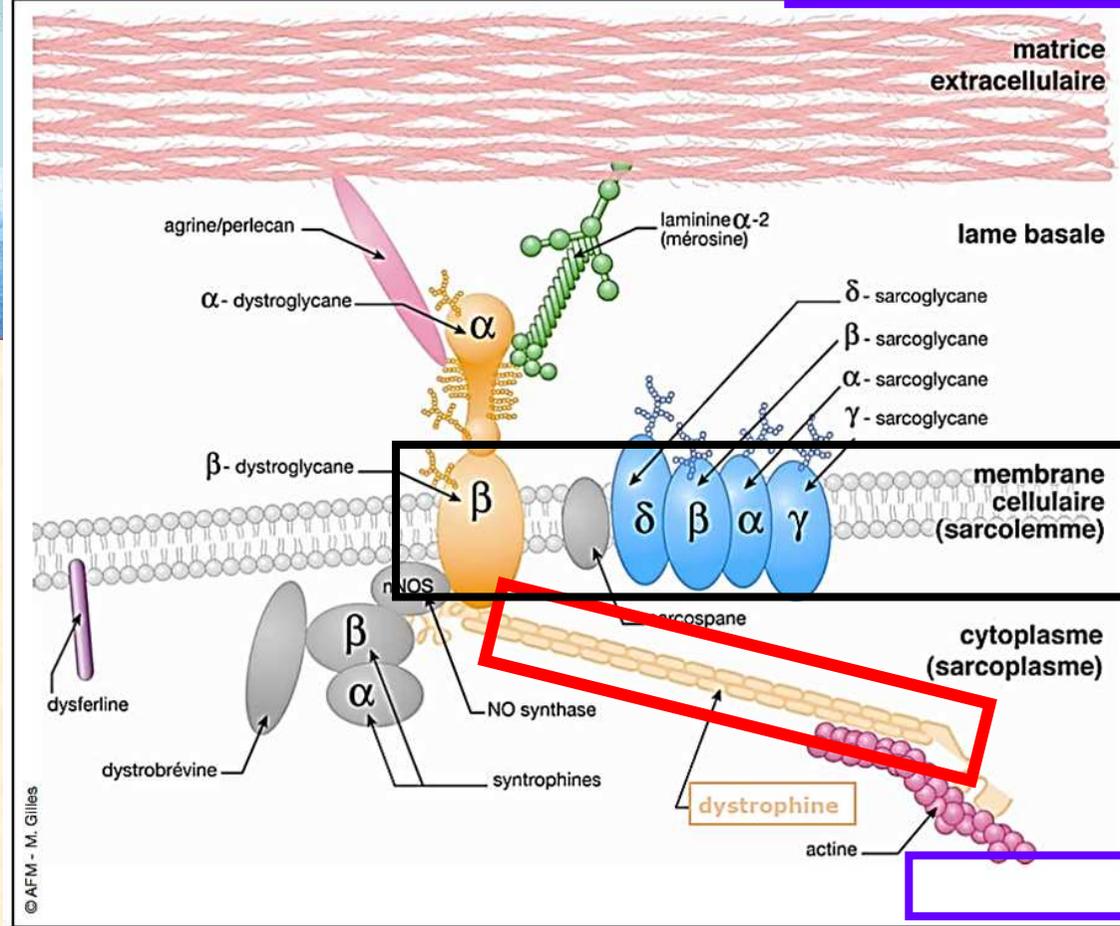
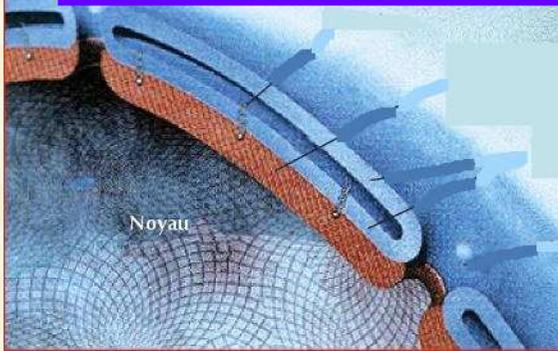




complexe glycoprotéique du sarcolemme

dystrophine

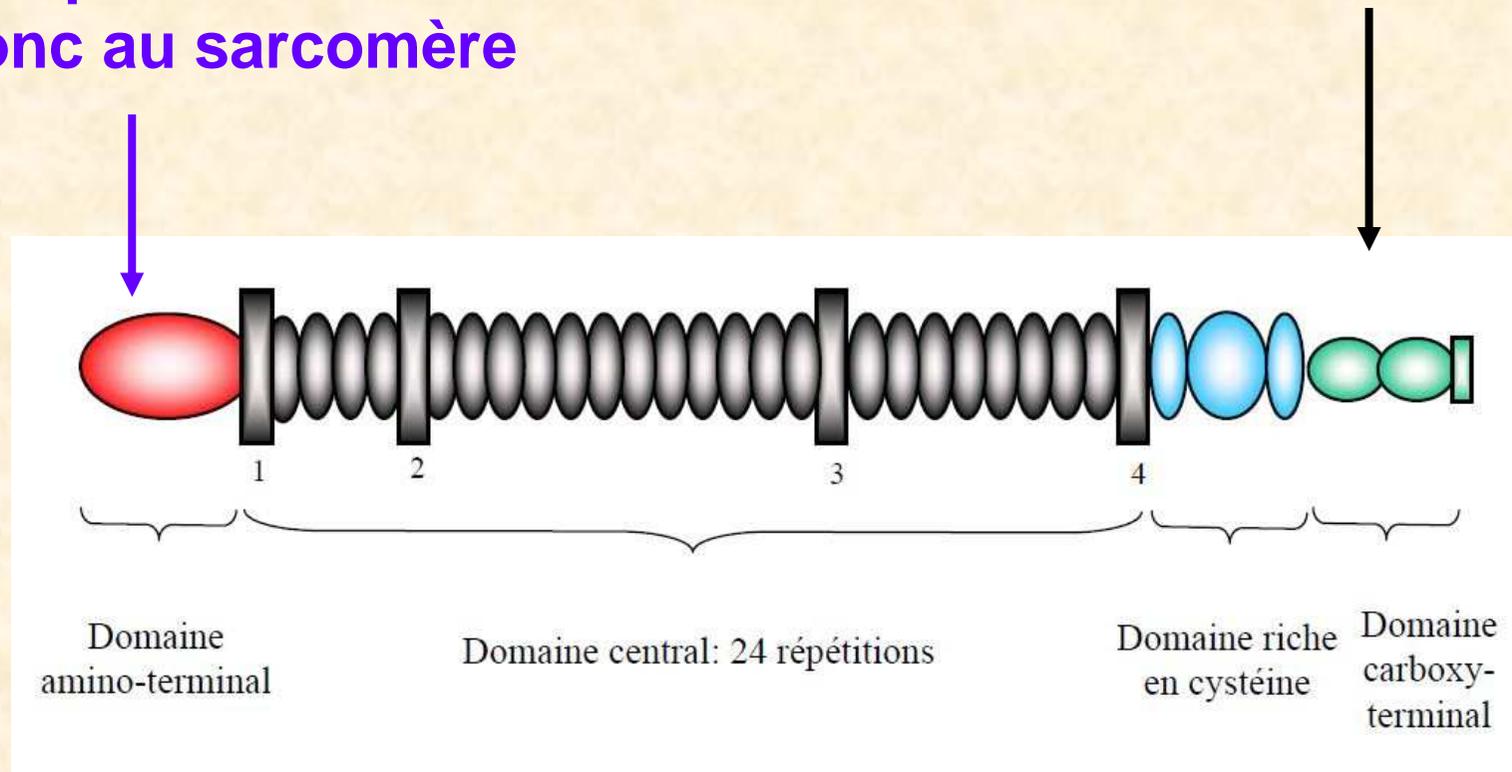
sarcomère



La dystrophine et ses 4 domaines

domaine N terminal
fixé à l'actine du
cytosquelette
et donc au sarcomère

domaine C terminal
fixé au complexe
de la membrane



- La dystrophine est une protéine de **427 kilo daltons** (kDa), formée de **3 685 acides aminés**, allongée et articulée.
- La dystrophine possède **2 zones stratégiques : ses 2 extrémités.**

Une extrémité est reliée à la région Z des *sarcomères*, les structures contractiles et l'autre est reliée au *sarcolemme* (=la membrane cellulaire). Elle joue donc un rôle important dans la **stabilité mécanique** des cellules musculaires durant la contraction musculaire.

II - Biologie moléculaire du gène de la dystrophine :

Le gène de la dystrophine a été **identifié** en **1986** sur le chromosome X et peu de temps après, c'est sa **structure** qui a été élucidée.

C'est à cette date que l'on a compris que ce gène était impliqué dans la BMD .

II - Biologie moléculaire du gène de la dystrophine :

- Avec ses 2,6 millions de paires de bases, il est le gène humain **le plus long**.

II - Biologie moléculaire du gène de la dystrophine :

C'est un gène **morcelé**

qui est formé de **79 exons**.

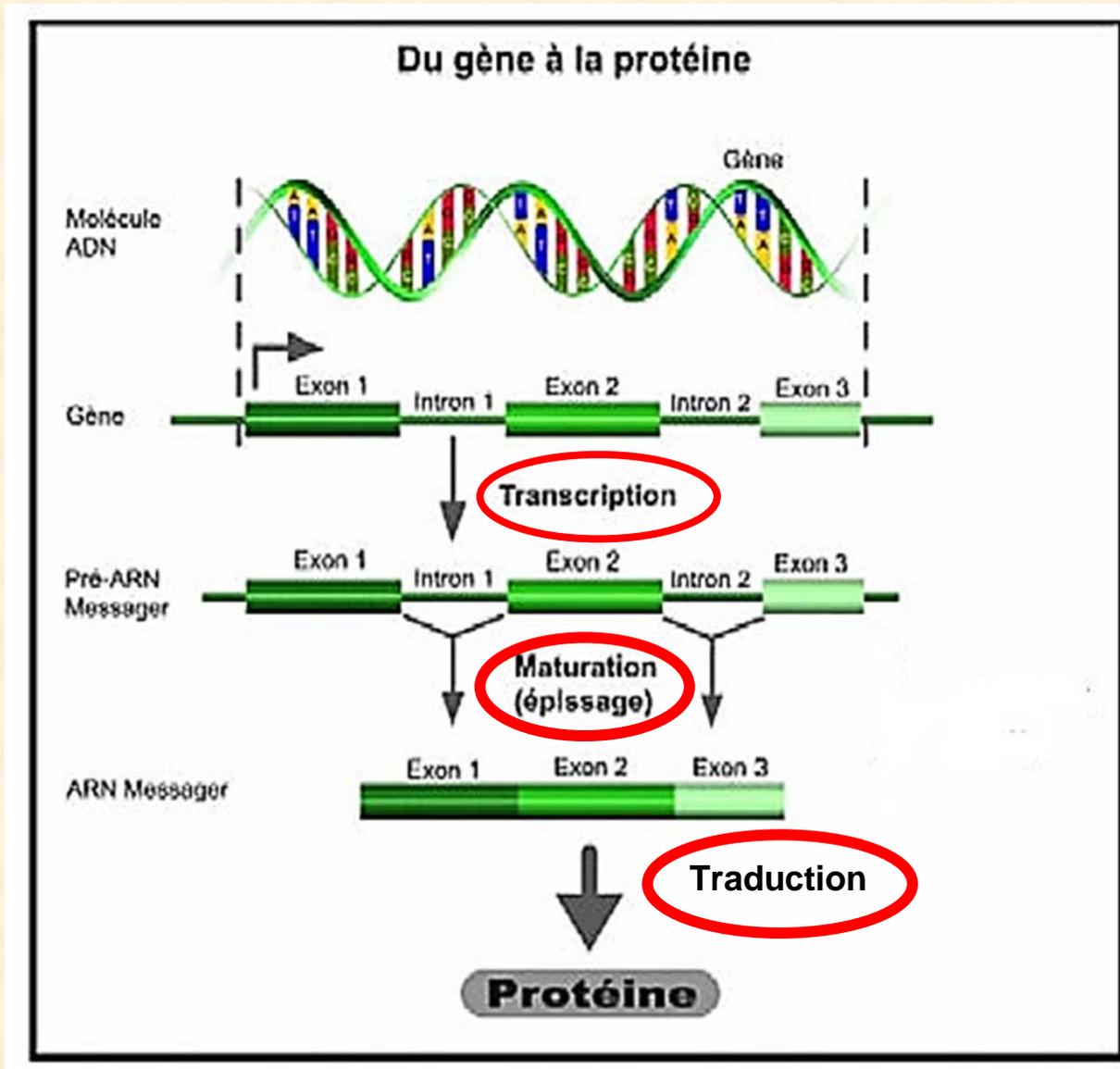
L'ensemble de ces 79 exons est constitué de 13.993 paires de bases soit **0,5%** du gène et contient la séquence codante active, c'est-à-dire l'information nécessaire à la synthèse des différentes formes de la protéine dystrophine.

- L'origine génétique des dystrophinopathies sont des délétions d'exons dans 65% des myopathies de Duchenne et 85 % des myopathies de Becker.
- Les autres cas correspondent à des insertions, des substitutions ou délétions ponctuelles.

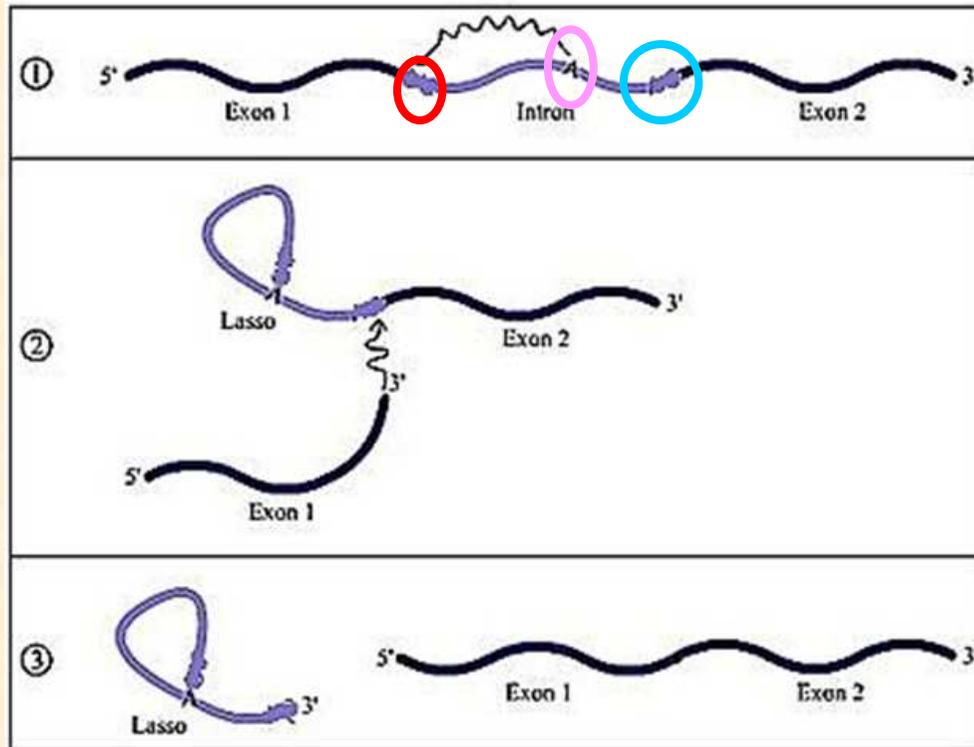
- Pour comprendre cette origine par délétion d'exons il nous faut donc quelques rappels et précisions sur l'épissage.

L'épissage

(découvert en 1977)



L'ARN pré-messager subit un épissage et l'ARN mature (messenger) ne contient **que les exons** [Expressed regiON]



Au cours du processus d'épissage, les introns sont éliminés (excision) et les exons raccrochés (=épissés = splicing) bout à bout pour reconstituer la continuité de la molécule d'ARN . La machinerie d'épissage reconnaît 3 parties différentes dans la molécule d'ARN pré-messager:

- Le site 5' de l'épissage **0** **Site donneur**
- Le site 3' de l'épissage **0** **Site receveur**
- Le point de branchement (avec A) **0**

- Ces sites correspondent à des **séquences courtes** d'ARN pré-messager qui ont été déduites de la comparaison de multiples introns.
- On vous propose de trouver ces **séquences dites consensus** et les **invariants** de ces séquences consensus en étudiant les 78 introns du gène de la dystrophine (gène DMD) disponible en ligne.
- Google : dmd.nl

- Google : dmd.nl

- the diseases

- Duchenne / Becker muscular dystrophy (DMD / BMD)
(*X-linked dilated cardiomyopathy - [XLDC](#)*)
 - *dystrophin (DMD) - [gene](#)*

Contents

- [Introduction](#)
- [Dystrophin](#)
 - [the dystrophin gene](#)

Legend:

Exon: numbering of exons and intron/exon boundaries are according to ..., with the first base of the Met-codon counted as position 1 (see [...reference sequence](#)). **E** basepairs. **Intron size:** size of intron indicated in kilobasepairs. **5' cDNA position:** first base of the exon (according to cDNA sequence ...). **Splice after:** splicing (0), after the first (1) or the second (2) base of a triplet. **Remarks:** 5'UTR = 5' untranslated region, 3'UTR = 3' untranslated region.

genomic sequences

(upstream sequence)

```
exon 01                                     tcct      -241
.
ggcatcagttactgtgttgactcactcagtggtgggatcactcactttccccctacagga      -181
.
ctcagatctgggaggcaattaccttcggagaaaaacgaataggaaaaactgaagtgttac      -121
.
ttttttaaagctgctgaagtttggtggtttctcattgttttaagcctactggagcaat      -61
.
aaagtttgaagaacttttaccaggtttttttatcgctgccttgatatacacttttcaa      -1
.
ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTT | 2 ATGAAAGAGAAGATGTTCAAAAGAAAACA      60
M L W W E E V E D C Y | E R E D V Q K K T      20
.
TTCACAAAATGGGTAATGCACAATTTTCTAAG | 3 TTGGGAAGCAGCATATTGAGAACCTC      120
F T K W V N A Q F S K | F G K Q H I E N L      40
.
TTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGCGCCTCCTAGACCTCCTCGAAGGCCTGACAGGGCAA      180
F S D L Q D G R R L L D L L E G L T G Q      60
.
AAACTG | 4 CCAAAAGAAAAGGATCCACAAGAGTTTCATGCCCTGAACAATGTCAACAAGGCA      240
K L | P K E K G S T R V H A L N N V N K A      80
.
CTGCGGGTTTTGCAGAACAATAAT | 5 GTTGATTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTA      300
L R V L Q N N N | V D L V N I G S T D I V      100
```

En cliquant
sur les chiffres
on accède
aux introns

Dystrophin gene - Intron 01

(intronic numbering for cDNA Reference Sequence)

Intron 1 of the DMD gene (transcript Dp427m) contains an alternative promoter encoding the [Purkinje cell Dp427p transcripts](#); this sequence [starts here](#).

```
gtaagtacaaagtaactaaaaatataatcttactgtggcataacgtttagttgtgacaag 31+60
ctcactaattaggtagattgattttaaattatcacagtagtttgcaaagaagcataaatg 31+120
ttatataactgcatatataatgtattttattcaggaatataatctttcattgggaaaa 31+180
cttttcaacagaaatggagtgtaaaagttttctttgcatagaactaaacacatgattt 31+240
cttgattaacaaaccactgcagtaatagaatatgcagaatgtcatttgactataacagat 31+300
ttatcttgattgctgtgagatagtttgatatctgagttattatcttgattagttgatac 31+360
ttccgtatttagtaacagttacataaaggttactgacctgacatatattctcaattgaac 31+420
```

Dystrophin gene - Intron 01

(intronic numbering for cDNA Reference Sequence)

Intron 1 of the DMD gene (transcript Dp427m) contains an alternative promoter encoding the [Purkinje cell Dp427p transcripts](#); this sequence [starts here](#).

```
gtaagtaaaaagtaactaaaaatataatctgtggcataacgtttagttgtgacaag 31+60
ctcactaattaggtagattgattttaaattatcacagtagtttgcaaagaagcataaatg 31+120
ttatatatactgcatatataatgtattttattcaggaatataatctttcattgggaaaa 31+180
cttttcaacagaaatggagtgtaaaagttttctttgcatagaactaaacacatgattt 31+240
cttgattaacaaaccactgcagtaatagaatatgcagaatgtcatttgactataacagat 31+300
ttatcttgattgctgtgagatagtttgatatctgagttattatcttgattagttgatac 31+360
ttccgtatttagtaacagttacataaaggttactgacctgacatatattctcaattgaac 31+420
```

GTAAGT : est le début de l'intron 1.

NB : la séquence est celle de l'ADNc , brin codant non transcrit ,

Dystrophin gene - Intron 01

(intronic numbering for cDNA Reference Sequence)

Intron 1 of the DMD gene (transcript Dp427m) contains an alternative promoter encoding the [Purkinje cell Dp427p transcripts](#); this sequence [starts here](#).

```
gtaagtaaaaagtaactaaaaatataatcttactgtggcataacgtttagtttgtagacaag 31+60
ctcactaattaggtagattgattttaaattatcacagtagtttgcaaagaagcataaatg 31+120
ttatatatactgcatatataatgtattttattcaggaatataatctttcattgggaaaa 31+180
cttttcaacagaaatggagtgtaaaagttttctttgcatagaactaaacacatgattt 31+240
cttgattaacaaaccactgcagtaatagaatatgcagaatgtcatttgactataacagat 31+300
ttatcttgattgctgtgagatagtttgatatctgagttattatcttgattagttgatac 31+360
ttccgtatttagtaacagttacataaaggttactgacctgacatatattctcaattgaac 31+420
```

GTAAGT : est le début de l'intron 1.

donc la séquence consensus de l'ARN pré-messager est GUAAGU

```
. . . . .
ctgggattacaggtgcatgccaccatgcctggctaatttttgatatttcagtagagatgg 32-301
. . . . .
ggtttcgccatggttgccctggctggtctcaaactactggcctcaagtgatccgtcctcac 32-241
. . . . .
tggcctcccaaactggtgggatcacaggcgtgagccaccgcctggccatttttcagaa 32-181
. . . . .
gtaattttaatttgatgccccaaaccagcatcactcatgtttaattccatttatcaatg 32-121
. . . . .
aatgtaataactaaatgtaaaaaaacactaacacatcataatggaaagtactttggttgt 32-61
. . . . .
aaaatatgaattatatttaaagttgcttcctaacttttatttttttatttttgcaatttag 32-1
```

ATTTTAG : fin de la séquence de l'intron 1

pour l'ADN brin codant non transcrit

AUUUUAG : fin de la séquence de l'intron d'ARN pré-messager

**Relevons les 6 premières bases
pour la séquence du site donneur
et les 7 dernières bases pour la
séquence du site receveur**

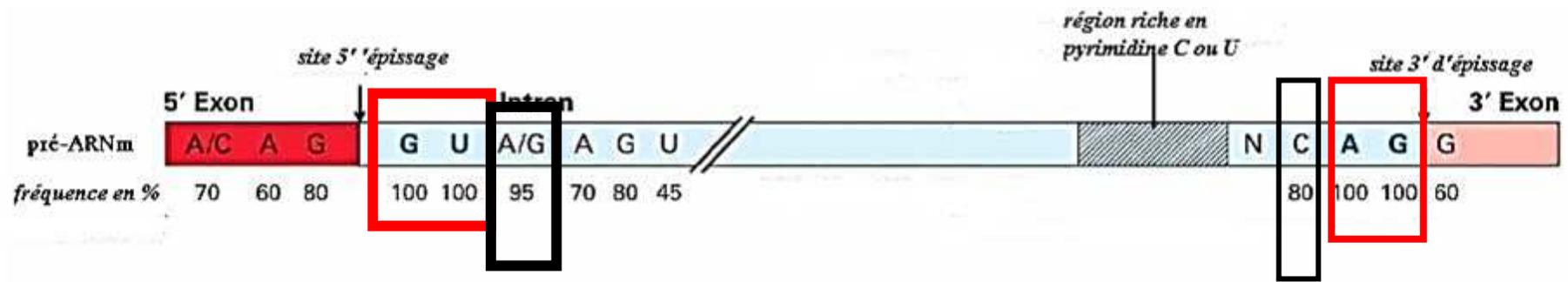
correction

N° de l'intron	Séquence du site donneur	Séquence du site récepteur
1	GUAAGU	AUUUUAG
2	GUAAGA	AUUUCAG
3	GUAUGU	UUCUCAG
4	GUAAGU	UUAACAG
5	GUAAGA	CAUGUAG
6	GUAAGA	GUUUUAG
7	GUUGGU	CUUACAG
8	GUAAAG	UCUGCAG
9	GUCUGU	UGUGCAG
10	GUAAAC	UUGUCAG
11	GUAAGU	UUUUCAG
12	GUAGGU	CUUUCAG
13	GUCAGA	UCUCCAG
14	GUGUGU	CUUGCAG
15	GUAUGU	UUAACAG

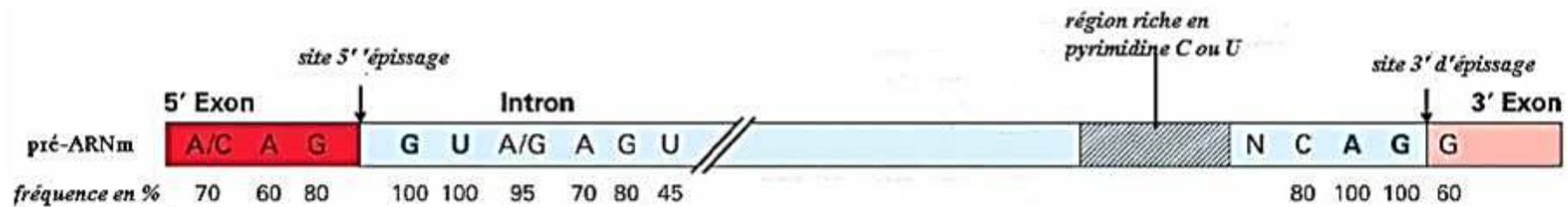
N° de l'intron	Séquence du site donneur	Séquence du site récepteur
1	GUAAGU	AUUUU AG
2	GUAAGA	AUUUC AG
3	GUAUGU	UUCUC AG
4	GUAAGU	UUAAC AG
5	GUAAGA	CAUGU AG
6	GUAAGA	GUUUU AG
7	GUUGGU	CUUAC AG
8	GUAAAG	UCUGC AG
9	GUCUGU	UGUGC AG
10	GUAAAC	UUGUC AG
11	GUAAGU	UUUUC AG
12	GUAGGU	CUUUC AG
13	GUCAGA	UCUCC AG
14	GUGUGU	CUUGC AG
15	GUAUGU	UUAAC AG

N° de l'intron	Séquence du site donneur	Séquence du site récepteur
1	GU A AGU	AUU U U AG
2	GU A AGA	AUU U C AG
3	GU A UGU	UUC U C AG
4	GU A AGU	UUA A C AG
5	GU A AGA	CAU G U AG
6	GU A AGA	GUU U U AG
7	GU U GGU	CUU A C AG
8	GU A AAG	UCU G C AG
9	GU C UGU	UGU G C AG
10	GU A AAC	UUG U C AG
11	GU A AGU	UUU U C AG
12	GU A GGU	CUU U C AG
13	GU C AGA	UCU C C AG
14	GU G UGU	CUU G C AG
15	GU A UGU	UUA A C AG

Séquences consensus autour les sites d'excision-épissage 5' et 3' dans les pré-ARNm des vertébrés.



Séquences consensus autour les sites d'excision-épissage 5' et 3' dans les pré-ARNm des vertébrés.



Séquence consensus en 5':

G U A/G A G U

R pour une purine : A ou G

G U R A G U

Les invariants :

G U

Séquence consensus en 3':

Y Y Y N C A G

Y pour une pyrimidine : C ou U

N : pour n'importe quelle base

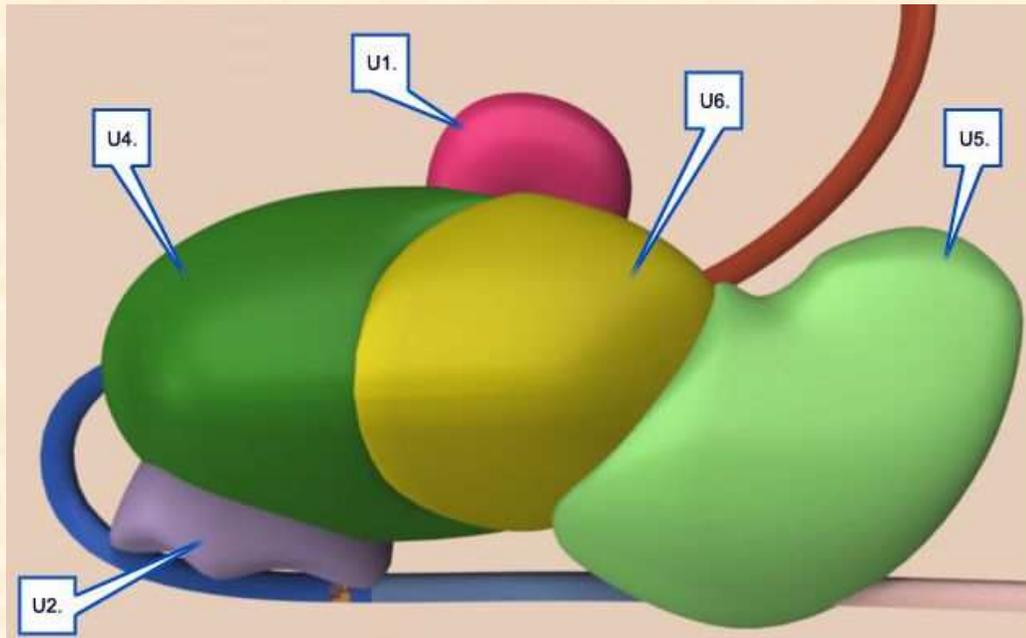
Les invariants :

A G

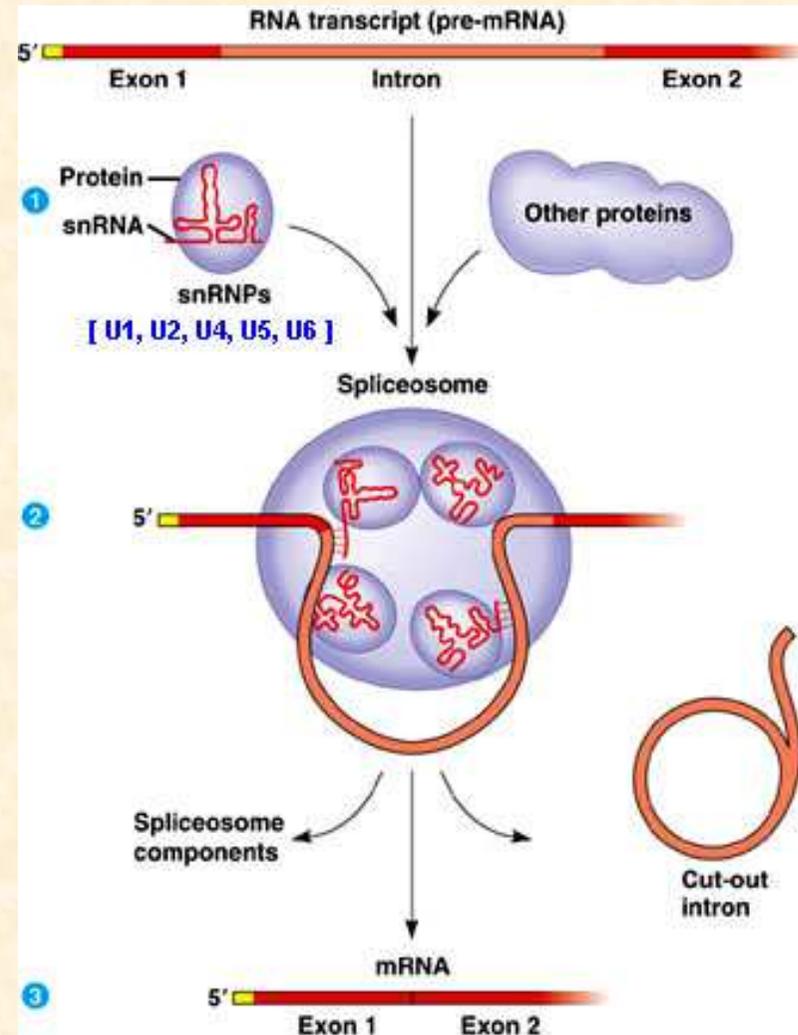
Les séquences les plus conservées sont les dinucléotides GU et AG, respectivement en 5' et en 3' de l'intron, et le nucléotide A au niveau du site de branchement.

Régulation de l'épissage

- La machinerie de l'épissage fait intervenir le **splicéosome** qui est un complexe de plus de 150 polypeptides et de **5 ribonucléoprotéines**
(U1 U2 U4 U5 et U6)

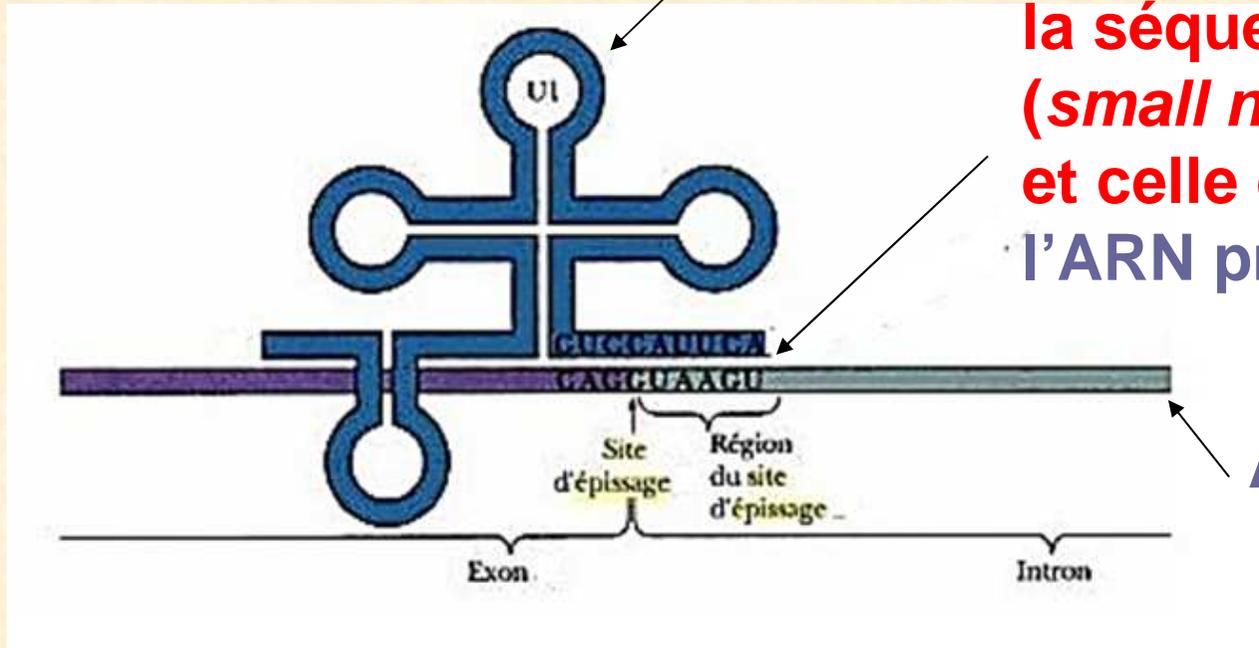


Chaque
ribonucléoprotéine
est constituée
d'une molécule courte
d'ARN
un ARNsn :
ARN small nuclear



U1 ARN sn

Reconnaissance des sites:
par appariement entre
la séquence de l'ARN sn
(*small nuclear*)
et celle de
l'ARN pré-messager



ARN pré-messager

Régulation de l'épissage:

Le splicéosome a une double fonction : **reconnaitre et sélectionner les sites d'épissage** mais aussi de **catalyser la ligation des exons**.

L'efficacité avec laquelle il va agir est déterminée par **une balance** entre différents critères comme :

- **la force des sites d'épissage (cad leur conformité par rapport aux séquences consensus)**
- **la taille des exons**
- **la présence de séquences auxiliaires.**

Ces séquences auxiliaires sont **courtes**
(moins de 10 nucléotides)
et peuvent être **exoniques**
ou **introniques**.

Ces **séquences régulatrices** peuvent
être **activatrices** ou **inhibitrices** !

Elles sont le lieu de fixation de protéines nucléaires.

Ces séquences régulatrices peuvent être **activatrices** ou **inhibitrices** !

ESE (*exonic splicing **enhancers***) = **activatrice**
et les ESS (*exonic splicing **silencers***) = **inhibitrice**
au niveau des exons.

ESE et ESS ont leurs homologues introniques
(ISE , **activatrice** , et ISS , **inhibitrice**)

L'épissage est donc influencé à la fois par
**la force des sites situés aux jonctions
exon-intron**

et

par **l'ensemble des effets activateurs et
inhibiteurs** des séquences exoniques et
introniques.

III – L'origine génétique des dystrophinopathies:

Ce sont des **anomalies d'épissage** par mutations affectant ces multiples séquences impliquées dans l'épissage qui sont à l'origine des **délétions d'exons** et donc des dystrophinopathies de Duchenne et de Becker (*dans la plupart des cas*).

- Les mutations à l'origine des DMD et BMD :
un seul gène pour ces 2 maladies.
- Chaque type de dystrophinopathies résulte de **délétions d'exons**
mais ce ne sont **pas les mêmes exons**
qui sont absents dans le cas d'une DMD
et d'une BMD.

Quelques exemples :

Délétion des exons 1 à 6	DMD	Délétion des exons 23 à36	BMD
Délétion des exons 1 à 5	DMD	Délétion des exons 21 à 22	BMD
Délétion de l'exon7	DMD	Délétion de l'exon 79	DMD
Délétion des exons 9 à 13	BMD	Délétion des exons 61 à 69	BMD
Délétion des exons 9 à16	BMD	Délétion de l'exon 50	DMD
Délétion des exons 9 à 20	BMD	Délétion de l'exon 46 à 54	BMD

- On se propose de comprendre pourquoi la DMD est associée à des délétions d'exons précis qui sont différents de ceux impliqués dans la BMD.

- Des pistes?



- **Dans un 1^o temps on va observer les différents exons du gène afin de les comparer.**

support papier ou séquence en ligne

- Les exons ont des longueurs variables et le nombre de bases n'est pas toujours un multiple de 3

CTGCGGGTTTTGCAGAACAATAAT ⁵ GTTGATTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTA	300
L R V L Q N <u>N</u> <u>N</u> V D L V N I G S T D I V	100
GATGGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTGATTGGAATATAATCCTCCACTGG TAG ⁶ GTC	360
D G N H K L T L G L I W N I <u>I</u> L H W Q V	120
AAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGATTGCAACAAACCAACAGTGAAAAGATTCTC	420
K N V M K N I M A G L Q <u>Q</u> T N S E K I L	140
CTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTCACC	480
L S W V R Q S T R N Y P Q V N V I N F T	160
ACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCAT AG ⁷ G CCAGACCTA	540
T S W S D G L A L N A L I H S H R P D L	180
TTTACTGGAATAGTGTGGTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTC	600
F D W N S V <u>V</u> C Q <u>Q</u> S A T Q R L E H A F	200
AACATCGCCAGATATCAATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAA E ⁸ AT TTGATACC	660
N I A R Y Q L G I E K L <u>L</u> D P E D V D T	220

- Les exons ayant un nombre variable de bases, on construit le

cadre de lecture du gène

de la dystrophine.

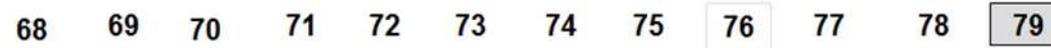
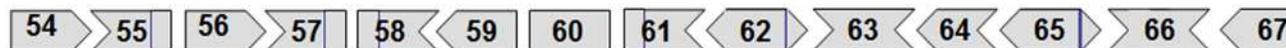
- Les exons **multiples de 3 bases** seront représentés par **des rectangles** dont les limites sont verticales , 

ceux qui ont **$3n+1$** par : 

et ceux qui ont **$3n +2$** par : 

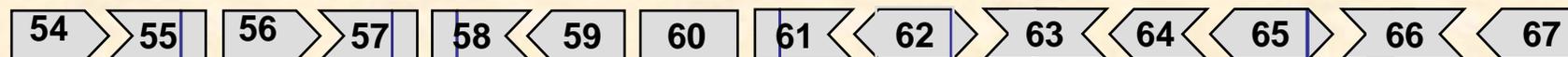
Différents cas sont proposés et distribués au hasard:

GENE DE LA DYSTROPHINE : LE CADRE DE LECTURE



correction

GENE DE LA DYSTROPHINE : LE CADRE DE LECTURE



2° temps : Recherche de la corrélation entre la sévérité de la maladie et les exons délévés:

Délétion des exons 1 à 6	DMD	Délétion des exons 23 à 36	BMD
Délétion des exons 1 à 5	DMD	Délétion des exons 21 et 22	BMD
Délétion de l'exon 7	DMD	Délétion de l'exon 79	DMD
Délétion des exons 9 à 13	BMD	Délétion des exons 61 à 69	BMD
Délétion des exons 9 à 16	BMD	Délétion de l'exon 50	DMD
Délétions des exons 9 à 20	BMD	Délétion de l'exon 46 à 54	BMD
Délétions de l'exon 62	DMD	Délétion de l'exon 43	DMD

correction

- Les délétions d'exons qui génèrent un **décalage du cadre de lecture** entraîne une **DMD** .
- Si le cadre de lecture n'est pas décalé **ET** si les exons sont en **position terminale** il s'agit aussi d'une **DMD**.

- Si le **cadre de lecture n'est pas décalé** et si les exons ne sont **pas en position terminale** il s'agit d'une **BMD**.
- Les BMD correspondent à des **dystrophines raccourcies** (appelée quasi-dystrophine) mais qui conserve ses 2 sites de fixation et qui **reste fonctionnelle**.

Seule la zone centrale est raccourcie mais la protéine peut encore assurer son rôle.

- **NB : la sévérité du phénotype (Duchenne ou Becker) n'est donc pas conditionnée par l'étendue des délétions mais par l'impact sur le **cadre de lecture** et la **localisation** (centrale ou terminale)**
- **Des dystrophines amputées de 46% (mini-dystrophines) et même 60 % (micro-dystrophines) restent fonctionnelles !**

Etude de cas d'insertion ou délétion ponctuelles dans un exon :en prenant l'exemple de l'exon 6 .

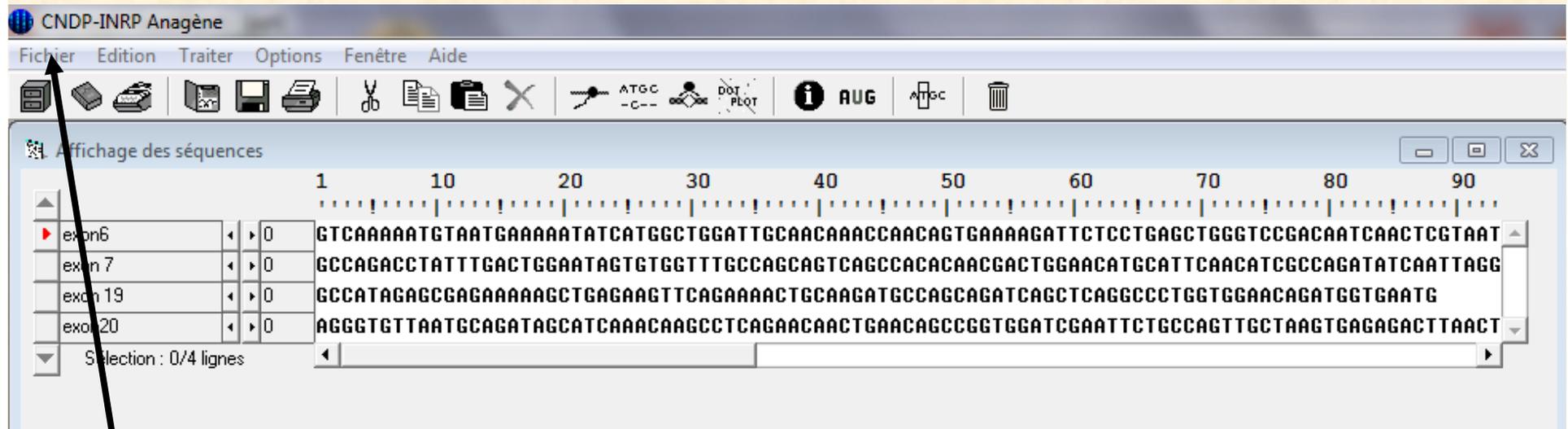
Recherche d'une mutation ponctuelle qui génère une DMD.

On peut travailler avec un logiciel comme ANAGENE. Pour cela il nous faut les séquences de

Séquence de l'exon 6

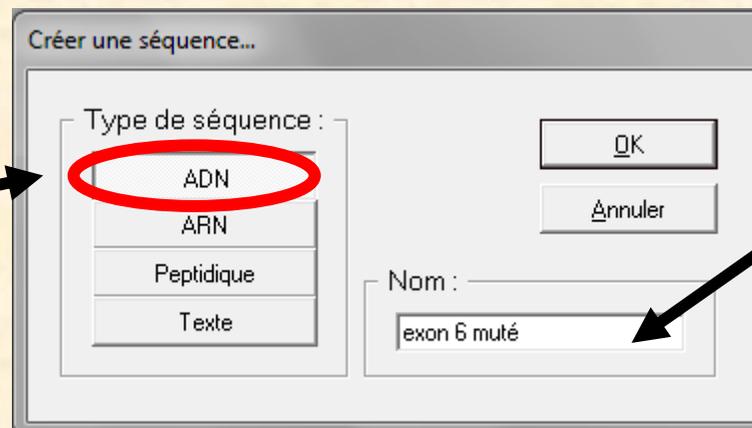
mais aussi de l'exon suivant l'exon 7





Créer...

Choisir
le type
de séquence

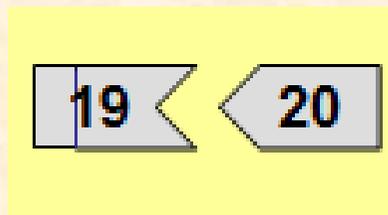


Donner un nom

On peut par copier-coller reprendre la séquence de l'exon 6 et ajouter ou supprimer une base.

**Puis on crée une nouvelle séquence :
exon 6 muté et exon 7
et on fait convertir en séquence protéique**

On dispose aussi des séquences des exons 19 et 20



Recherche d'une mutation ponctuelle qui génère une BMD

Exemple de mutation : insertion d'une adénine en fin d'exon 6

CTGCGGGTTTGCAGAACAAATAAT <u>5</u>	GTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTA	300
L R V L Q N <u>N</u> <u>N</u> V D L V N I G S T D I V		100
GATGGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTGATTGGAATATAAATCCTCCACTGGCAG <u>6</u>	GTC	360
D G N H K L T L G L I W N I <u>I</u> L H W Q V		120
AAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGATTGCAACAAACCAACAGTGAAAAGATTCTC		420
K N V M K N I M A G L Q <u>Q</u> T N S E K I L		140
CTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTCACC		480
L S W V R Q S T R N Y P Q V N V I N F T		160
ACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCATAG A <u>7</u>	GCCAGACCTA	540
T S W S D G L A L N A L I H S H R P D L		180
TTTGACTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTC		600
F D W N S V <u>V</u> C Q <u>Q</u> S A T Q R L E H A F		200
AACATGCCAGATATCAATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAG <u>8</u>	ATGTTGATACC	660
N I A R Y Q L G I E K L <u>L</u> D P E D V D T		220

Exemple de mutation : insertion d'une adénine en fin d'exon 6

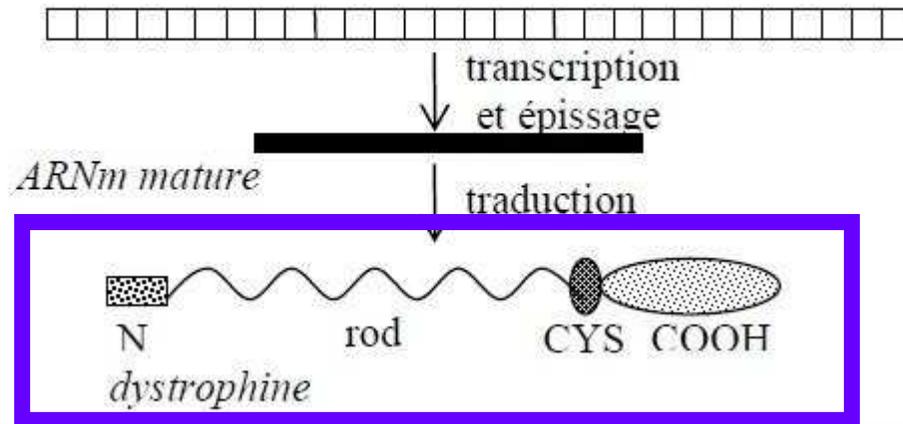
CTGCGGGTTTGCAGAACATAAT <u>5</u>	GTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTA	300
L R V L Q N <u>N</u> <u>N</u> V D L V N I G S T D I V		100
GATGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTGATTGGAATATAAATCCTCCACTGGCAG <u>6</u>	GTC	360
D G N H K L T L G L I W N I <u>I</u> L H W Q V		120
AAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGATTGCAACAAACCAACAGTGAAAAGATTCTC		420
K N V M K N I M A G L Q <u>Q</u> T N S E K I L		140
CTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTCACC		480
L S W V R Q S T R N Y P Q V N V I N F T		160
ACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCATAG A <u>7</u>	GCCAGACCTA	540
T S W S D G L A L N A L I H S H R P D L		180
TTTGA CT GGAAATAGTGTGGTTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTC		600
F D W N S V <u>V</u> C Q <u>Q</u> S A T Q R L E H A F		200
AACATGCCAGATATCAATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAG <u>8</u>	ATGTTGATACC	660
N I A R Y Q L G I E K L <u>L</u> D P E D V D T		220

Exemple de mutation : insertion d'une adénine en fin d'exon 6
ou de n'importe quelle base

un **codon stop** apparaît dans **l'exon 7**
en position **182** (TGA au lieu de TTT) et
la dystrophine est raccourcie (elle n'a
plus que 546 AA) et ne possède plus
son site terminale. → **DMD**

Il y a de très nombreux triplets stop potentiels
qui apparaissent par décalage induit
par insertion ou délétion d'une base

Situation normale.



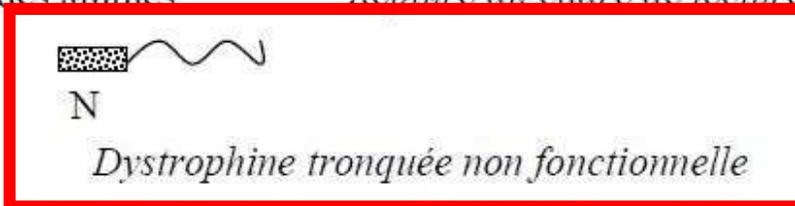
N : domaine N terminal, rod : Domaine central répété, CYS : Domaine riche en cystéine, COOH : domaine C terminal.

d'après <http://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/BEN4685.pdf>

a- Mutation de type Duchenne



Mutation ponctuelle qui génère un codon stop

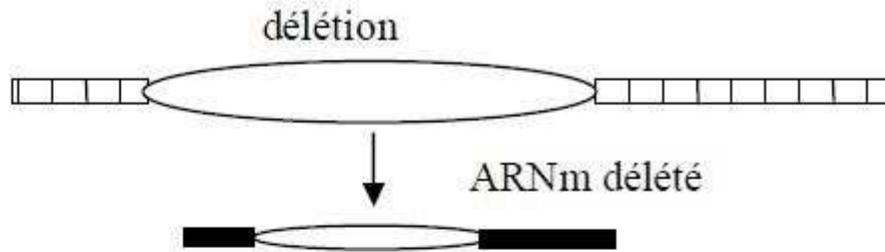


Exemple de la dystrophie musculaire de Duchenne par délétion du gène DMD

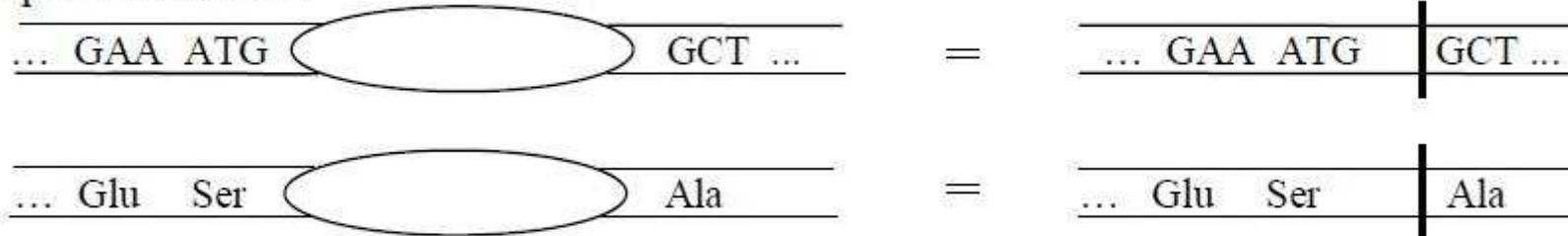
Pour qu'une mutation ponctuelle génère une **BMD , le cadre de lecture ne doit pas être décalé et il faut insérer ou supprimer 3 bases en tout.**

- Exemple : **insertion de 2 Adénines en fin de l'exon 19 et d'une Adénine en début de l'exon 20 .**

b- Mutation de type Becker



séquence de codons



séquence correspondante en acides aminés

maintien du cadre de lecture



Dystrophine anormale partiellement fonctionnelle

Exemple de la dystrophie musculaire de Becker par délétion du gène DMD

**Mutation ponctuelle
qui maintient
le cadre de lecture**

IV - Une thérapie d'espoir : la « chirurgie du gène »

A - Le principe :

Copier la nature dans un objectif thérapeutique

Une stratégie d'épissothérapie ablative :

le saut d'exon thérapeutique (= SET)

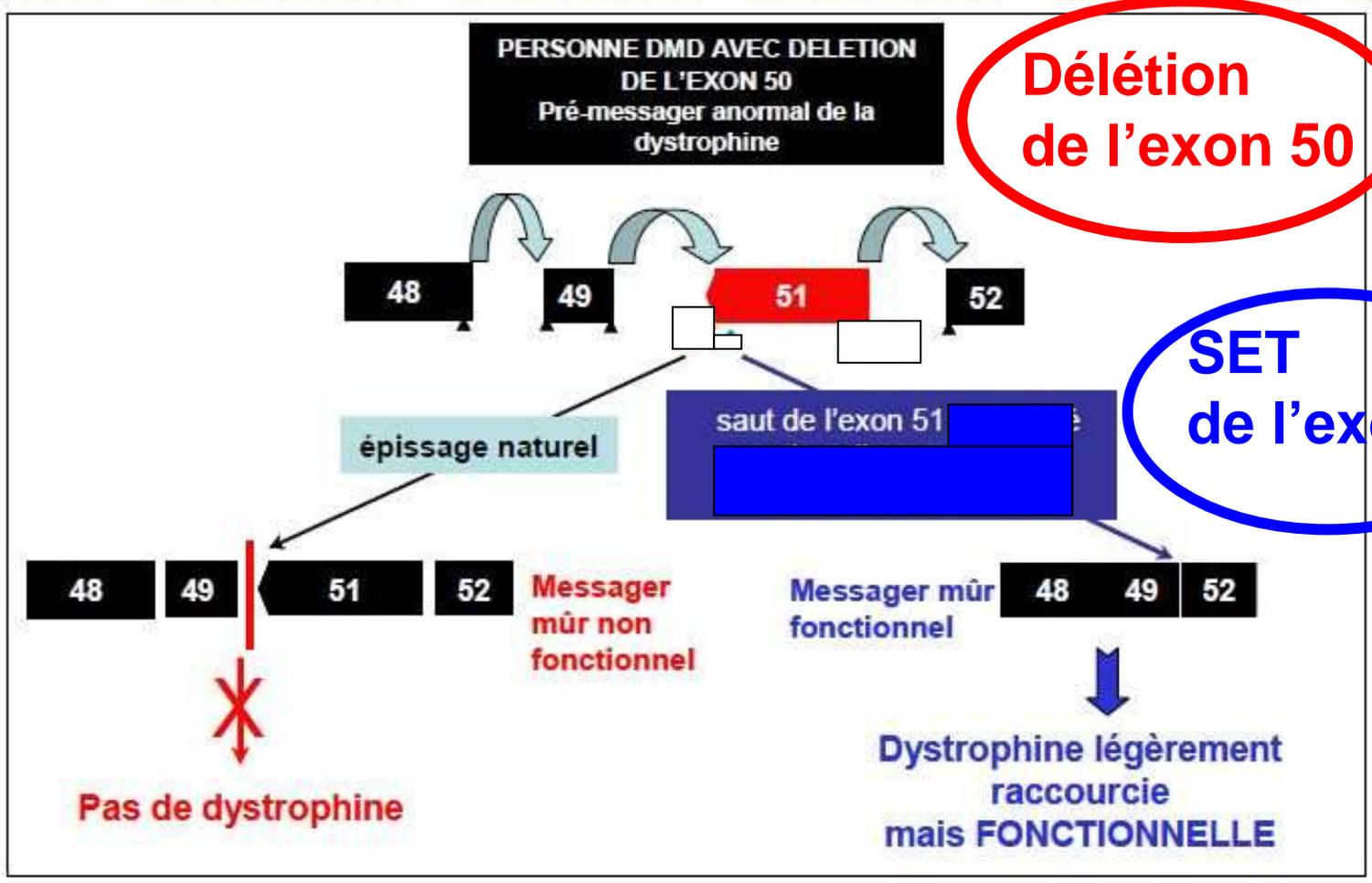
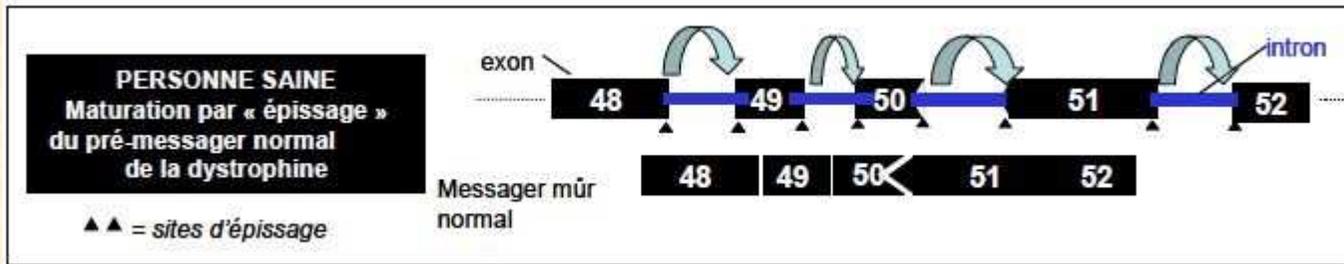
***exon skipping* des anglais**

Recherche du saut d'exon adapté à différentes mutations à l'origine de DMD et de ses effets:

On peut reprendre les différents cas du tableau dont la mutation la plus fréquente : délétion de l'exon 50

Délétion des exons 1 à 6	DMD	Délétion des exons 23 à 36	BMD
Délétion des exons 1 à 5	DMD	Délétion des exons 21 et 22	BMD
Délétion de l'exon 7	DMD	Délétion de l'exon 79	DMD
Délétion des exons 9 à 13	BMD	Délétion des exons 61 à 69	BMD
Délétion des exons 9 à 16	BMD	Délétion de l'exon 50	DMD
Délétions des exons 9 à 2	BMD	Délétion de l'exon 46 à 54	BMD
Délétion de l'exons 62	DMD	Délétion de l'exon 43	DMD

Délétion des exons 1 à 6	DMD	Délétion des exons 23 à36	BMD
Délétion des exons 1 à 5	DMD	Délétion des exons 21 et 22	BMD
Délétion de l'exon7 SET 6-8	DMD	Délétion de l'exon 79	DMD
Délétion des exons 9 à 13	BMD	Délétion des exons 61 à 69	BMD
Délétion des exons 9 à16	BMD	Délétion de l'exon 50 SET 51	DMD
Délétion des exons 9 à20	BMD	Délétion de l'exon 46 à 54	BMD
Délétion de l' exon 62 SET 63	DMD	Délétion de l'exon 43 SET 44 - 46	DMD

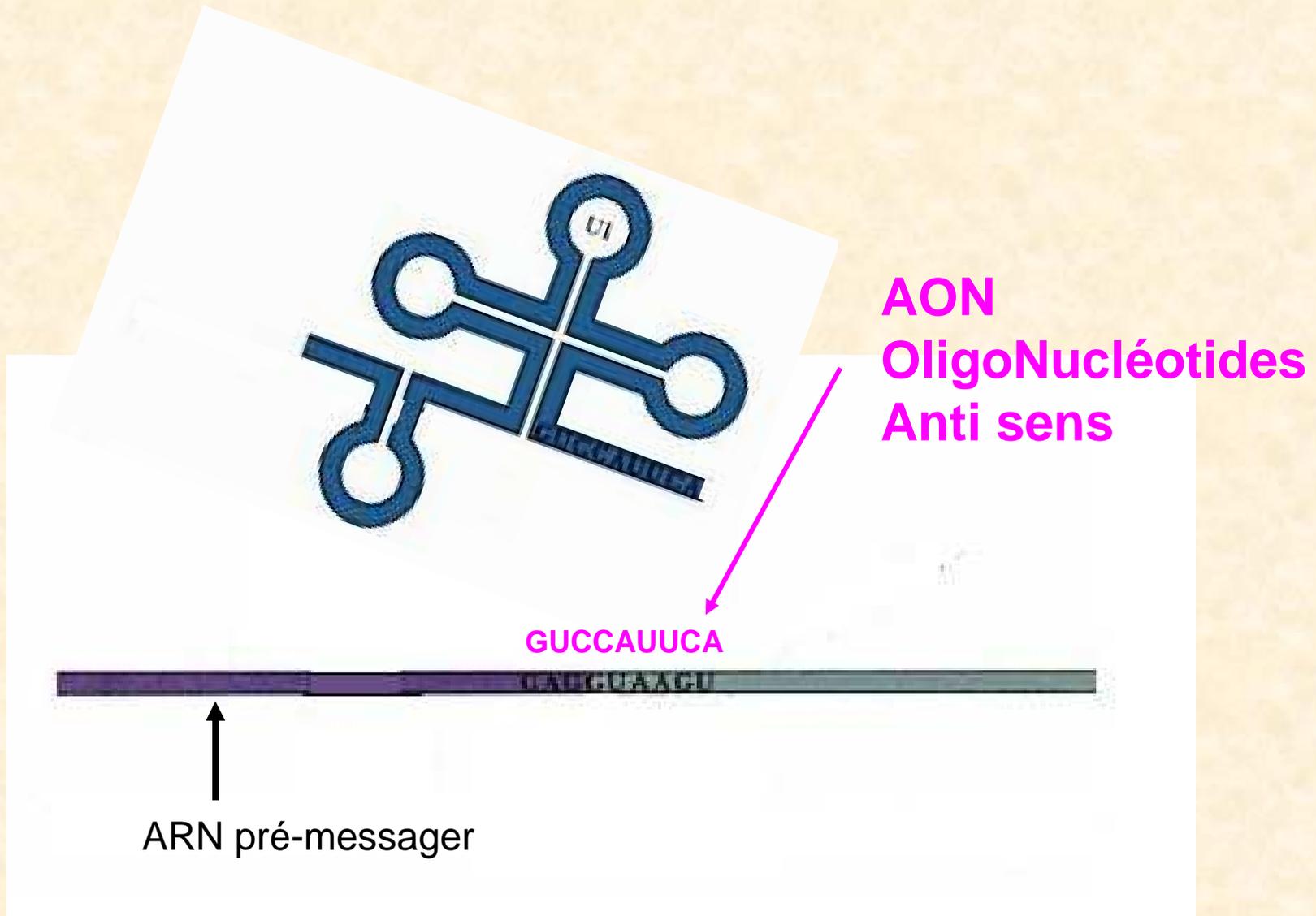


Le cas de mutation ponctuelle :

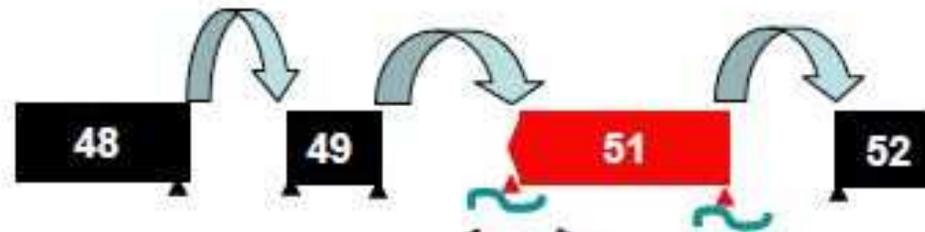
- **Insertion de l'Adénine en fin de l'exon 6**

**il faut faire sauter l'exon 6 jusqu'à
l'exon qui permet de rattraper le cadre
de lecture à savoir l'exon 8 inclus**

Les outils du saut d'exon thérapeutique:



**PERSONNE DMD AVEC DELETION
DE L'EXON 50**
Pré-messager anormal de la
dystrophine



épissage naturel

saut de l'exon 51 provoqué
par des oligonucléotides
anti-sens ciblés



**Messageur
mûr non
fonctionnel**

**Messageur mûr
fonctionnel**



Pas de dystrophine

**Dystrophine légèrement
raccourcie
mais FONCTIONNELLE**

Il existe une **banque de données** qui répertorie plus de 800 cas documentés moléculairement. Cette banque donne :

- Les **conséquences directes** de toute mutation sur le cadre de lecture
- Tous les **profils d'épissage** qui seraient **correcteurs**
- La **taille de la dystrophine** résultante
- La carte des **cibles** à viser par les oligo - nucléotides anti-sens pour obtenir un SET

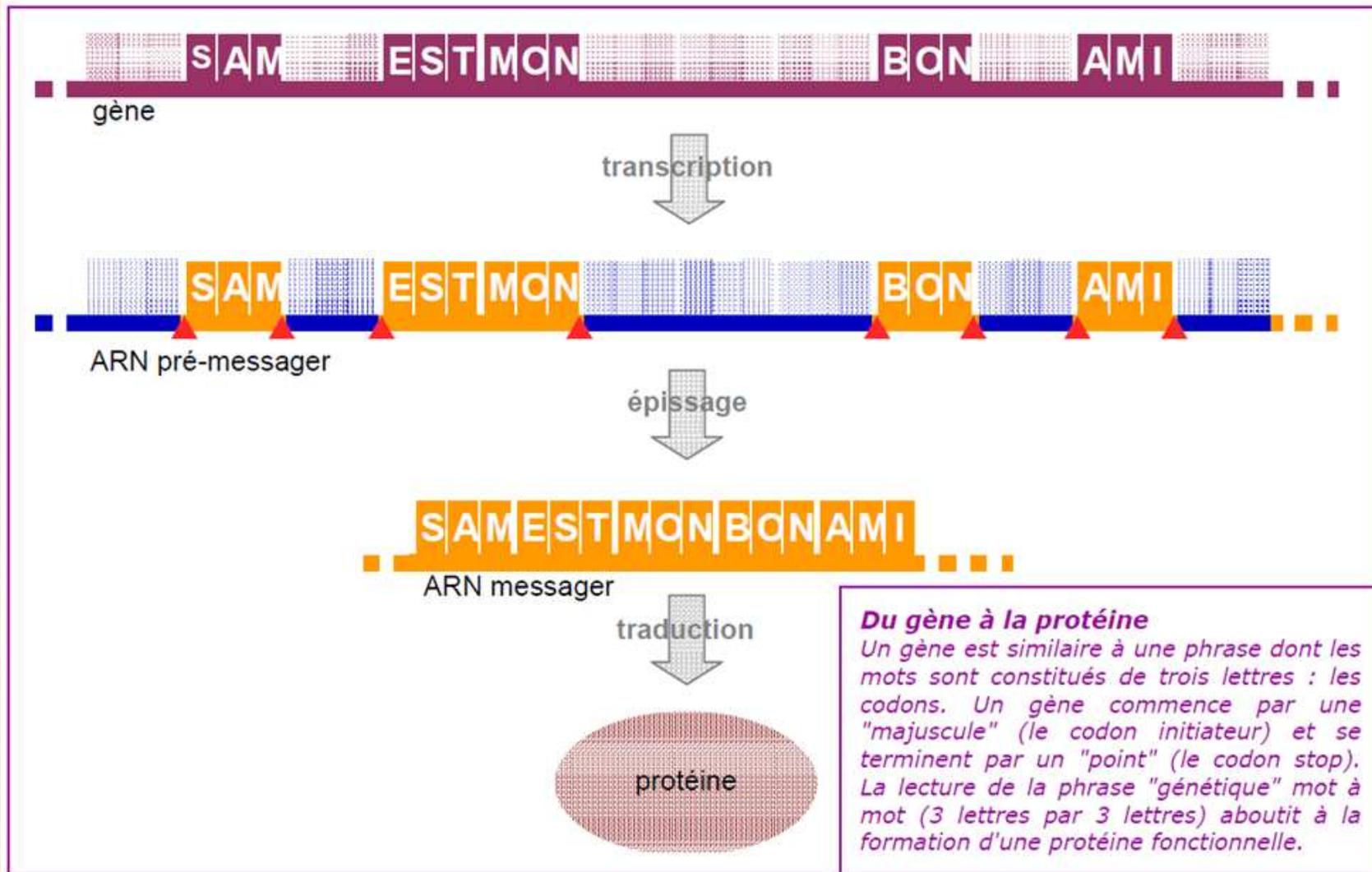
Cette approche exige de
**connaître exactement la séquence du gène
du patient.**

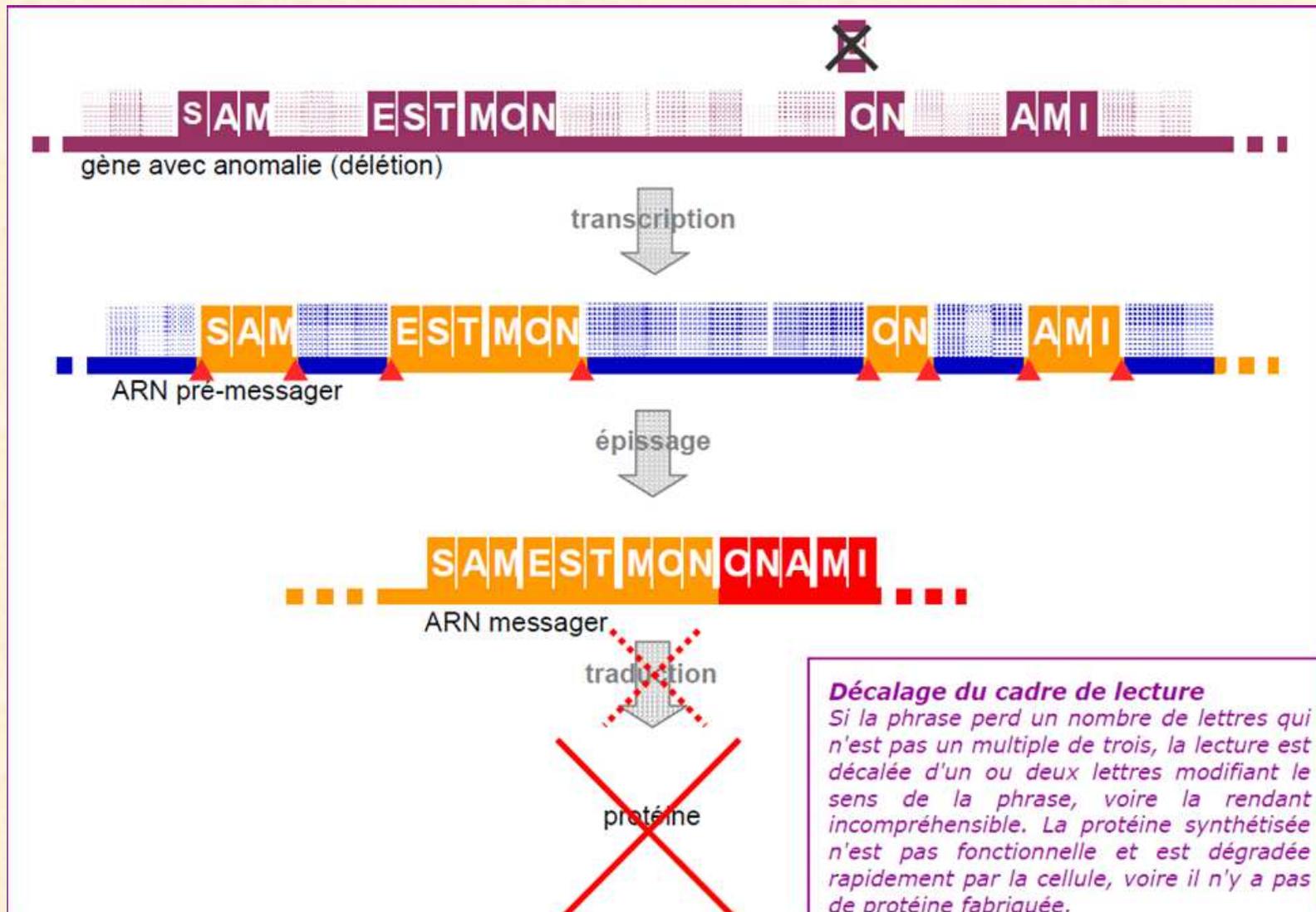
→ c'est **une thérapie à la « carte »**

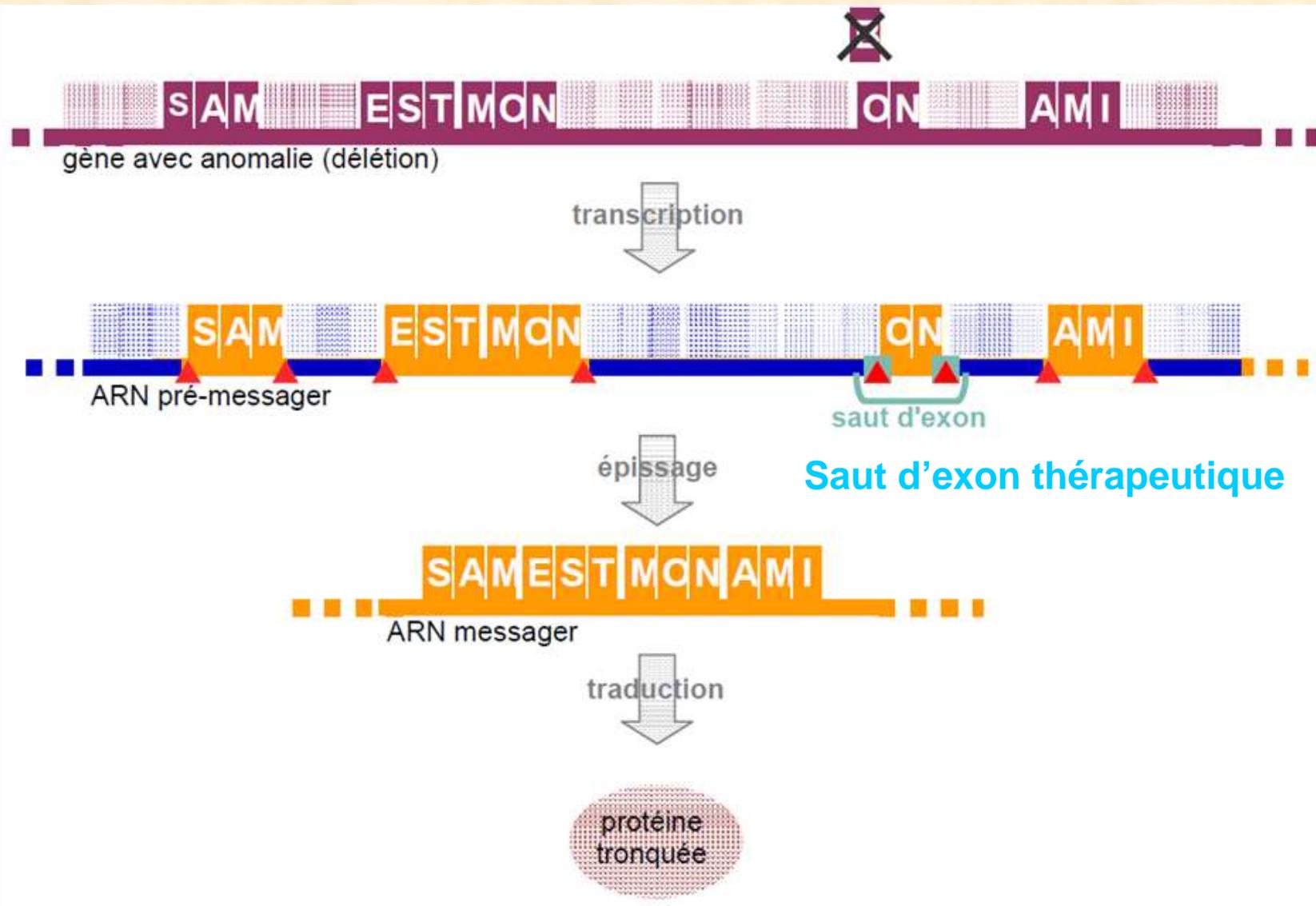
- Un saut d'un exon peut cependant corriger plusieurs mutations .
- les mutations les plus fréquentes sont une délétion de l'exon 50 qui génère un codon stop dans l'**exon 51 dont le saut thérapeutique** pourrait traiter 13 % des malades DMD et restaurer le cadre de lecture pour la délétion de l'exon 50 mais aussi **d'autres types de délétions** .
- **RECHERCHONS** d'autres délétions traitables par ce saut thérapeutique de l'exon 51 :

Délétion 45- 50	raccord 44 à52
Délétion 47- 50	raccord 46 à52
Délétion 48-50	raccord 47 à 52
Délétion 49 -50	raccord 48 à 52
Délétion 52	raccord 50 à 53
Délétion 52-58	raccord 50 à 59
Délétion 52 -61	raccord 50 à 62
Délétion 52-63	raccord 50 à 64
Délétion 52-64	raccord 50 à 65
Délétion 52-66	raccord 50 à 67

Une analogie pour illustrer l'origine des dystrophinopathies et le saut d'exon thérapeutique







C . Essais cliniques :

Dans la **phase I** on vérifie l'**innocuité** du procédé chez des volontaires sains. Mais ici chez des volontaires **malades**.

La **phase II** consiste à vérifier l'**efficacité thérapeutique** sur un petit nombre de malades.

La **phase III** comporte une **analyse randomisée** et contrôlée, effectuée sur un effectif plus important, et en variant les doses. Elle vise à démontrer d'une part l'efficacité thérapeutique du protocole choisi, d'autre part sa supériorité par rapport à un **placebo** et aux méthodes thérapeutiques conventionnelles.

C'est la dernière étape avant l'homologation et l'utilisation clinique.

- En pratique, un essai clinique de **phase I** sur la myopathie de Duchenne a été réalisé en **2007**.
Mené chez quatre jeunes garçons malades, atteints de la myopathie de Duchenne, (**Pays-Bas**), il portait sur le saut d'exon par oligonucléotides antisens visant au saut de **l'exon 51** .
L'injection des AON a été **intramusculaire**.
- Les résultats ont montré que la quasi-dystrophine était **exprimée** dans le muscle injecté des 4 patients.

- Un autre essai clinique de **phase I** a été réalisé sur la myopathie de Duchenne (**Angleterre**). Il s'agit ici d'un saut d'exon par morpholinos (un autre type d'oligonucléotides antisens) en injection intramusculaire chez 7 garçons atteints de DMD âgés de 12 à 16 ans.
- Les résultats de cet essai publiés fin août **2009**, montrent que le produit est bien **toléré** et que la dystrophine est de nouveau **produite** localement dans le muscle injecté et ce de façon **proportionnelle à la dose injectée**.

Essai clinique de **Phase I-II a**:

- Une seconde étude avec l'AON visant **l'exon 51** a été réalisée chez 12 enfants malades, cette fois ci par une voie systémique *via* des injections sous-cutanées abdominales.
- Le bénéfice du traitement a été **mesuré** de deux manières : biologiquement, avec la mesure du taux de dystrophine dans les **biopsies** (par immunofluorescence et western blot) et cliniquement avec la mesure de la distance parcourue en six minutes (le ***six minutes walk test – 6MWT***).

Un autre essai en **phase II** vise à évaluer la **tolérance et l'efficacité** d'une administration **intraveineuse** répétée une fois par semaine pendant 3 mois de morpholinos chez 24 garçons atteints de DMD âgés de 5 à 15 ans et présentant une anomalie pouvant être corrigée par le saut **d'exon 51** du gène DMD.

L'AON « PRO051 » est actuellement en essai de **phase III** :

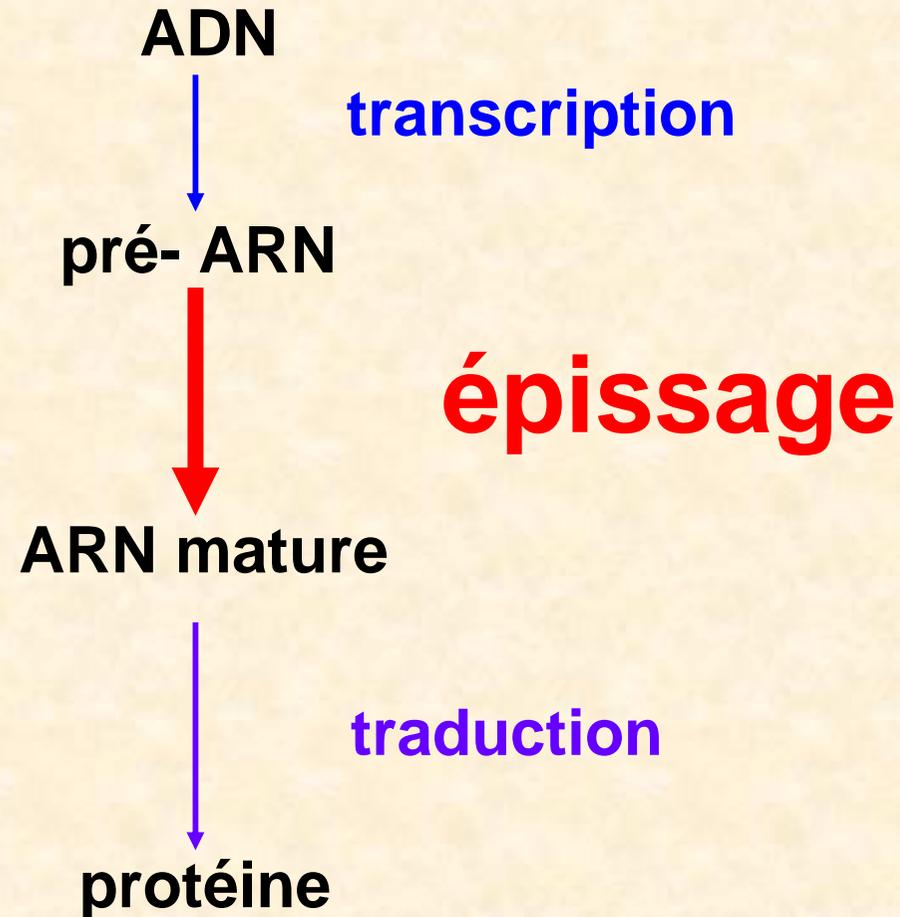
c'est une étude **randomisée** contre **placebo** avec comme critère de jugement principal l'évaluation de la fonction musculaire par le 6MWT.

MAIS

**Il semblerait cependant que la force musculaire
ne soit pas suffisamment restaurée.**

CONCLUSION :

Du gène à la protéine : 3 étapes et non 2 !!



Depuis une dizaine d'années l'analyse des maladies génétiques recherche désormais **des mutations des séquences régulatrices de l'épissage** qui génèrent des délétions d'exons.

Sites donneurs et accepteurs

Splice Site Prediction http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

MaxEntScan http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq_scoreseq.html

GeneSplicer http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html

Sites donneurs, accepteurs et de branchement

Splice Site Finder <http://www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html>

ESE

ESE finder <http://exon.cshl.org/ESE/index.html>

Rescue ESE <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>

Tableau I. Logiciels de reconnaissance et d'analyse des séquences consensus d'épissage. Les différents sites d'épissage recherchés ont des séquences consensus relativement conservées, ce qui autorise leur identification par différents algorithmes. Ces algorithmes permettent également d'évaluer quantitativement l'impact de modifications nucléotidiques au sein de ces séquences car un score est attribué pour chaque base, pour chaque position, par comparaison avec l'hypothèse la plus probable. Concernant la liste présentée (non exhaustive) d'« outils web » de prédiction, il est possible d'interroger simultanément ces différents sites, ce qui simplifie grandement la procédure (données disponibles sur demande). Il existe d'autres logiciels dédiés à l'identification des séquences réglant la transcription [32, 33].

De telles mutations ont déjà été identifiées pour de nombreuses **autres maladies** comme :

Le cancer du sein et de l'ovaire

La fibrose kystique

L'anémie de Fanconi

Le syndrome de Lesch-Nyhan

L'immunodéficience combinée sévère

Des leucémies

L'Alzheimer

La rétinite pigmentaire

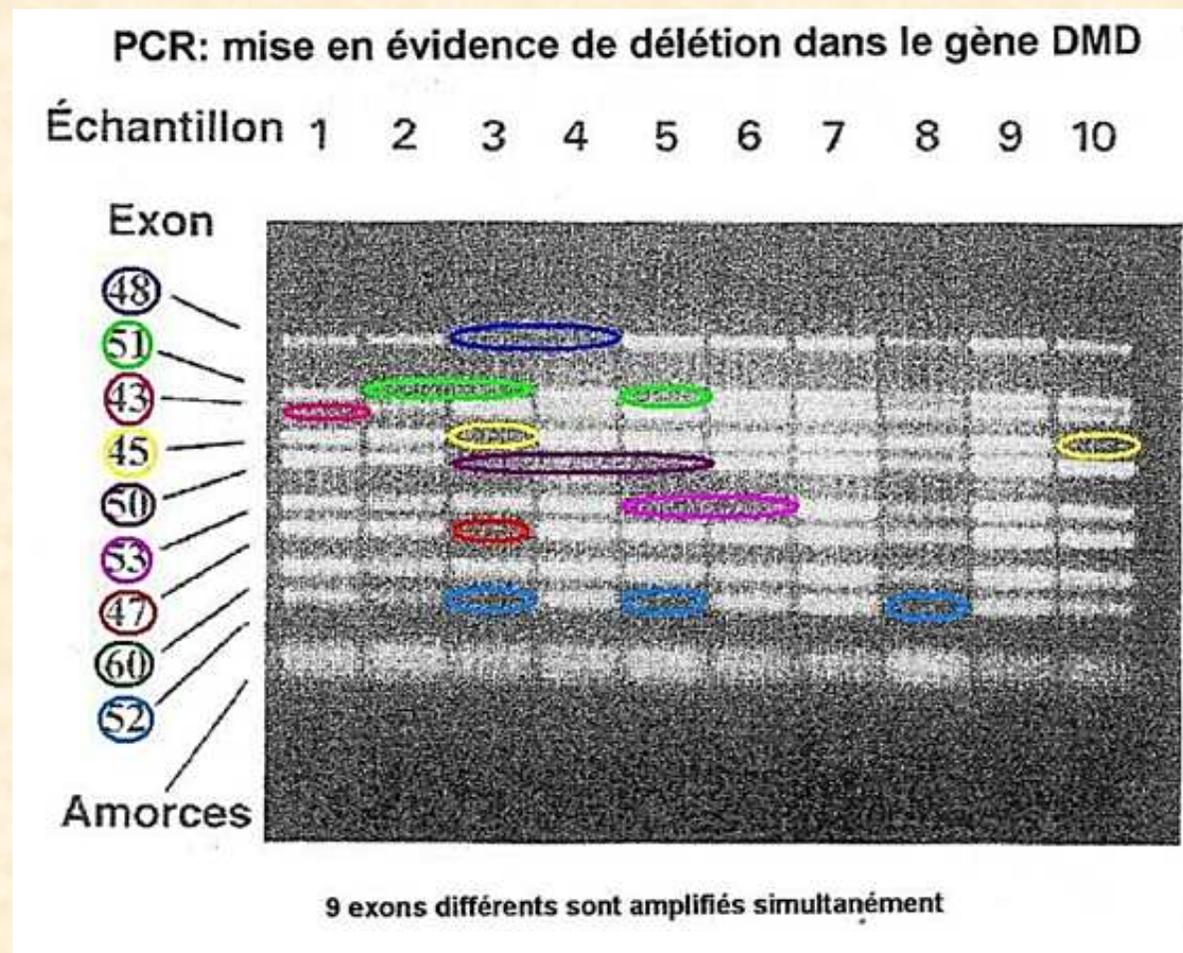
L'azoospermie

La mucoviscidose

L'hémophilie A

....

C'est donc une **approche nouvelle** de la recherche de l'origine génétique des maladies.
On construit le **cadre de lecture du gène** et on recherche les **exons absents** des patients :



Le **saut d'exon thérapeutique** est aussi en train d'être testé pour **d'autres maladies** mais les essais sont moins avancés que pour les dystrophinopathies.

C'est la **particularité de la dystrophine** (qui peut rester fonctionnelle tout en étant très raccourcie dans son domaine centrale) qui a permis les avancées pour les 2 maladies DMD et BMD.

Comment utiliser ces nouvelles données en lycée ?

- L'épissage et l'expression des gènes est au programme de 1^{er}S.
- L'origine génétique de maladie par délétion d'exons n'est pas au programme.

Une suggestion : question de type IIB

- A partir de l'étude de documents et de vos connaissances, **expliquer**

l'origine de la myopathie de Duchenne

et

en quoi l'utilisation de saut d'exons est un espoir thérapeutique pour les malades.

Un doc de **Présentation des 2 formes de maladie** : DMD et BMD :

- sévérité contrastée,
- le rôle de la dystrophine
- la protéine codée par le même gène qui est

soit très raccourcie et non fonctionnelle
soit partiellement tronquée et encore fonctionnelle.

Séquence partielle du gène normal et de la version DMD avec insertion ou délétion ponctuelle qui génère un triplet stop

Extrait de la séquence du brin transcrit de l'ADN au niveau de l'exon 44 d'un allèle codant une dystrophine normale :

A partir du nucléotide 1 127 547:

GCT AAA CTG TCT AGA ACA CAA CTC TTT

Extrait de la séquence du brin transcrit de l'ADN au niveau de l'exon 44 d'un allèle codant une dystrophine défectueuse :

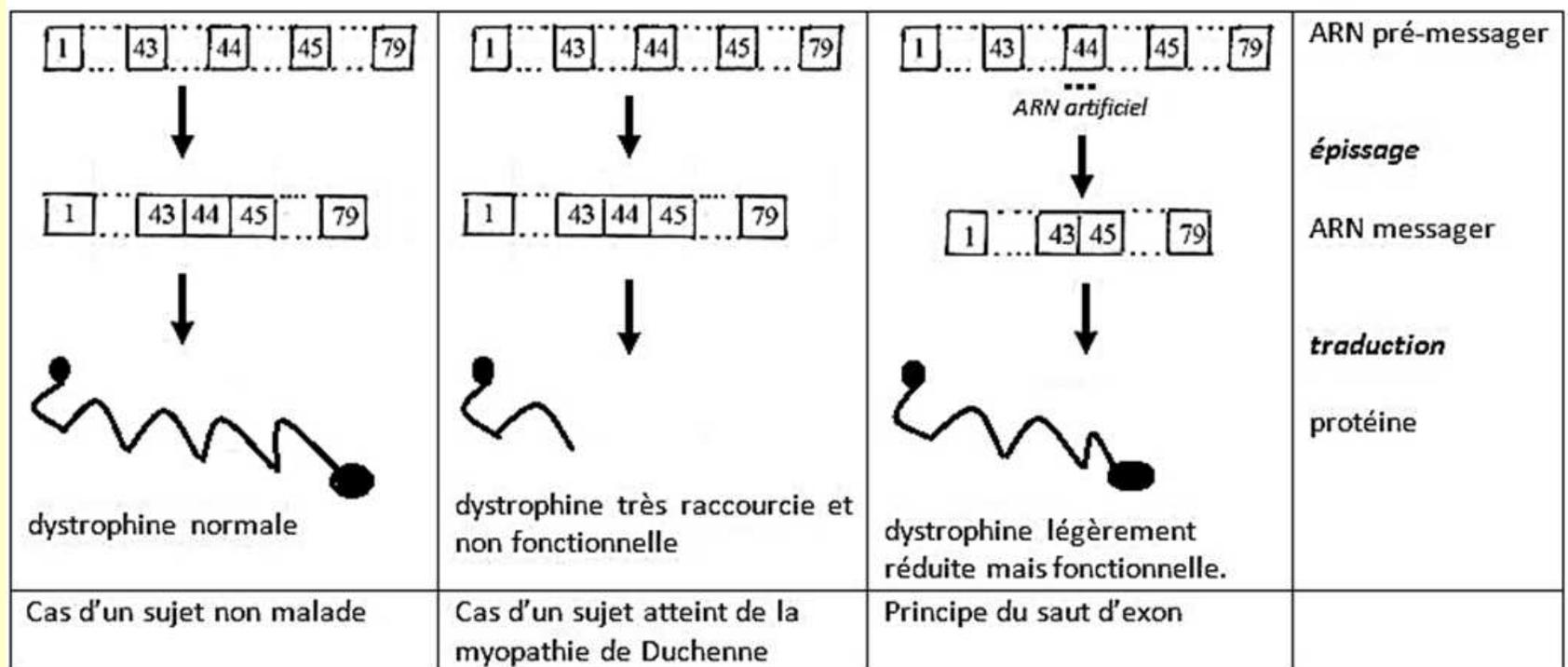
A partir du nucléotide 1 127 547 :

CGC TAA ACT GTC TAG AAC ACA ACT CTT T

Présentation du principe du saut d'exon thérapeutique :
une possibilité thérapeutique de réparation de la mutation de la myopathie de Duchenne :

Cet espoir thérapeutique consiste à utiliser de **courtes séquences d'ARN artificiels** qui viennent se fixer sur des séquences précises d'ARN pré-messager par complémentarité et qui **perturbent alors l'épissage en éliminant l'exon initial** qui est reconnu comme intron. Cette suppression d'exon permet de **rétablir le cadre de lecture perturbé par la mutation**.

La dystrophine produite est alors plus courte mais peut rester fonctionnelle.



Mercantideetaussivotezreéhououte

AON

A O N

AON

AON

Mercantideetaussivotezreéhououte

Merci de votre écoute