

# Chapitre 5 - Mutations

## Pathologie Moléculaire

Ce chapitre est destiné à illustrer par quelques exemples les mécanismes généraux des mutations que nous avons évoquées dans le cours du génome. Nous distinguerons selon une classification classiques les grandes lésions (macro-lésions) et les petites lésions (micro-lésions).

Nous examinerons les conséquences possibles de ces mutations en soulignant quelques liens entre ces mutations et les phénomènes intervenant dans l'évolution ou avec des pathologies d'intérêt médical, par exemple les maladies héréditaires dues à des altérations moléculaires du génome de la lignée germinale, soit des pathologies non héréditaires associées à des altérations du génome des lignées somatiques (et observées dans de nombreuses tumeurs).

**1 - Macro-lésions**

**2 - Micro-lésions**

**3 - Exemples**

# Pathologie Moléculaire du DNA et des Protéines



## 1 - Macro-lésions : lésions altérant de grands segments de DNA

### Les macro-lésions – Structure des lésions

- Délétions (perte de DNA) de grands fragments  
et fusions de gènes
- Duplications et amplifications (gain de DNA supplémentaire)
- Inversions et translocations

### Les mécanismes des macro-lésions

- Recombinaisons inégales
- Transposition
- Cassures et réparations imparfaites  
(ex. excision de boucles chromatinienne)

## 1 - Macro-lésions et micro-lésions : taille des lésions moléculaires

Les macro-lésions, comme leur nom l'indique, sont des lésions de grande taille du génome, parfois visibles en microscopie optique sur le caryotype (lésions de très grande taille: plusieurs Mpb), soit moins grandes, altérant la structure du génome sur plusieurs kbp à l'échelle d'un ou plusieurs gènes (détectées dans ce cas par les techniques de biologie moléculaire).

Les micro-lésions sont plutôt des lésions survenant à l'échelle de un à quelques nucléotides jusqu'à un petit segment de gène.

Il n'y a pas de frontière nette entre les deux types de lésions (car cela n'a d'intérêt ni conceptuel, ni technique, ni biologique, ni médical). A noter enfin qu'il n'y a pas de parallélisme entre la taille des lésions moléculaires et les altérations du phénotype: certaines grandes lésions moléculaires peuvent être silencieuses et passer inaperçus, alors que certaines mutations ponctuelles ont des effets catastrophiques et sont pathogènes, voire parfois rapidement léthales.

# 1 - Macro-lésions - structure des macro-lésions

## - Altérations de grands fragments de DNA

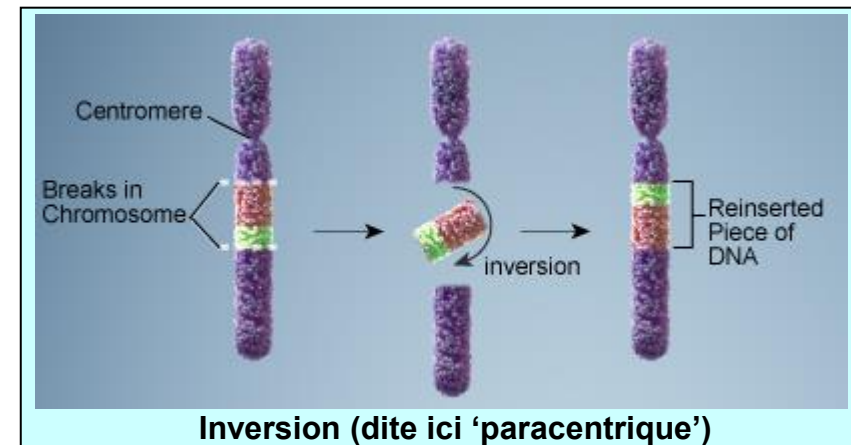
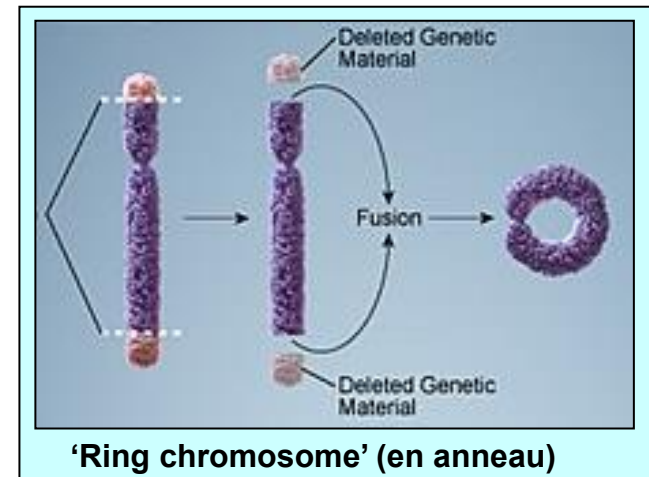
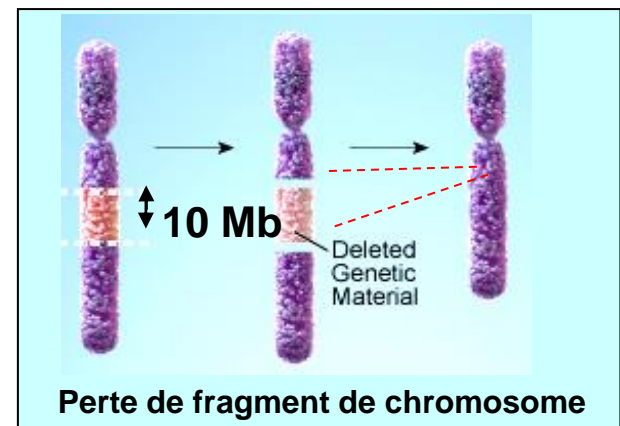
Certaines macro-lésions, de très grande taille sont visibles en microscopie optique sur le caryotype. Elle peuvent concerner la taille d'un segment de bras de chromosome:

- \* soit diminué (exemple ci-contre) traduisant une perte (délétion) de matériel génétique (de plusieurs millions de pb (Mpb) ou plusieurs dizaines de Mpb).
- \* soit plus grand traduisant un gain (insertion) de matériel génétique (de grande taille) provenant soit d'un fragment d'un autre chromosome, soit d'une duplication partielle d'un segment du chromosome.

Parfois, elles concernent la morphologie d'un chromosome: dans l'exemple ci-contre, formation d'un 'ring-chromosome' (en anneau) par fusion des extrémités d'un chromosome linéaire (par réparation imparfaite consécutive à une délétion des extrémités du chromosome).

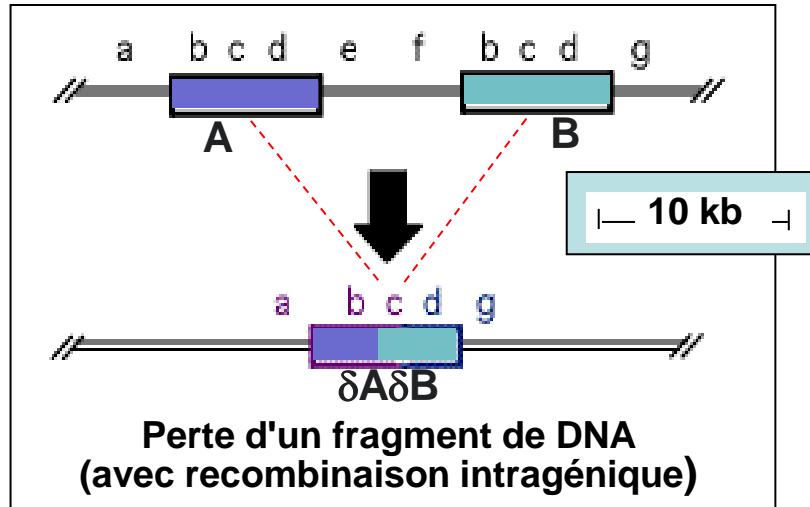
Parfois, elles concernent la structure fine d'un chromosome (sans perte ni gain de matériel génétique). Dans l'exemple ci-contre, une inversion d'un fragment de bras d'un chromosome résulte d'une cassure libérant un fragment qui est ensuite réinséré par une réparation imparfaite avec inversion du segments.

Ces exemples ne sont pas exhaustifs et, bien d'autres types de lésions du DNA entrent dans cette catégorie.



# 1 - Macro-lésions - structure des macro-lésions

## - Perte de matériel génétique : Délétion d'un grand fragment de DNA

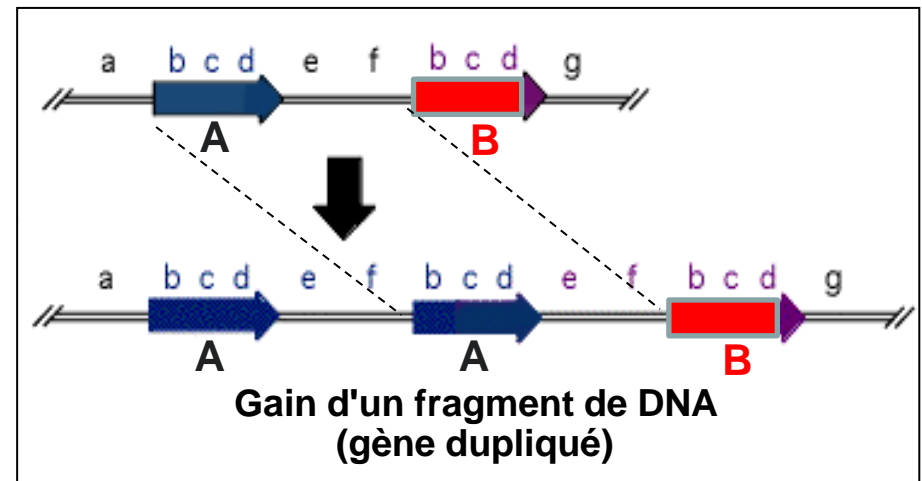


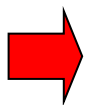
D'autres macro-lésions ont souvent une taille plus petite (par exemple, à l'échelle de dizaines de kbp ou plus) et ne sont pas visibles sur le caryotype. Elles sont détectées par des techniques de biologie moléculaire qui étudient la taille de grands segments de DNA ou par séquençage.

Dans le premier exemple ci-contre (à gauche), la délétion d'une partie du gène A, du DNA intergénique et d'une partie du gène B aboutit à former un gène de fusion constitué des deux parties restantes ( $\delta A \delta B$ ).

## - Gain de matériel génétique : Duplication de grands fragments de DNA

Dans le second exemple, ci-contre, la duplication du gène A et du segment 'ef' de DNA intergénique aboutit à un gain de DNA avec insertion d'une séquence génique supplémentaire (fonctionnelle ou non).

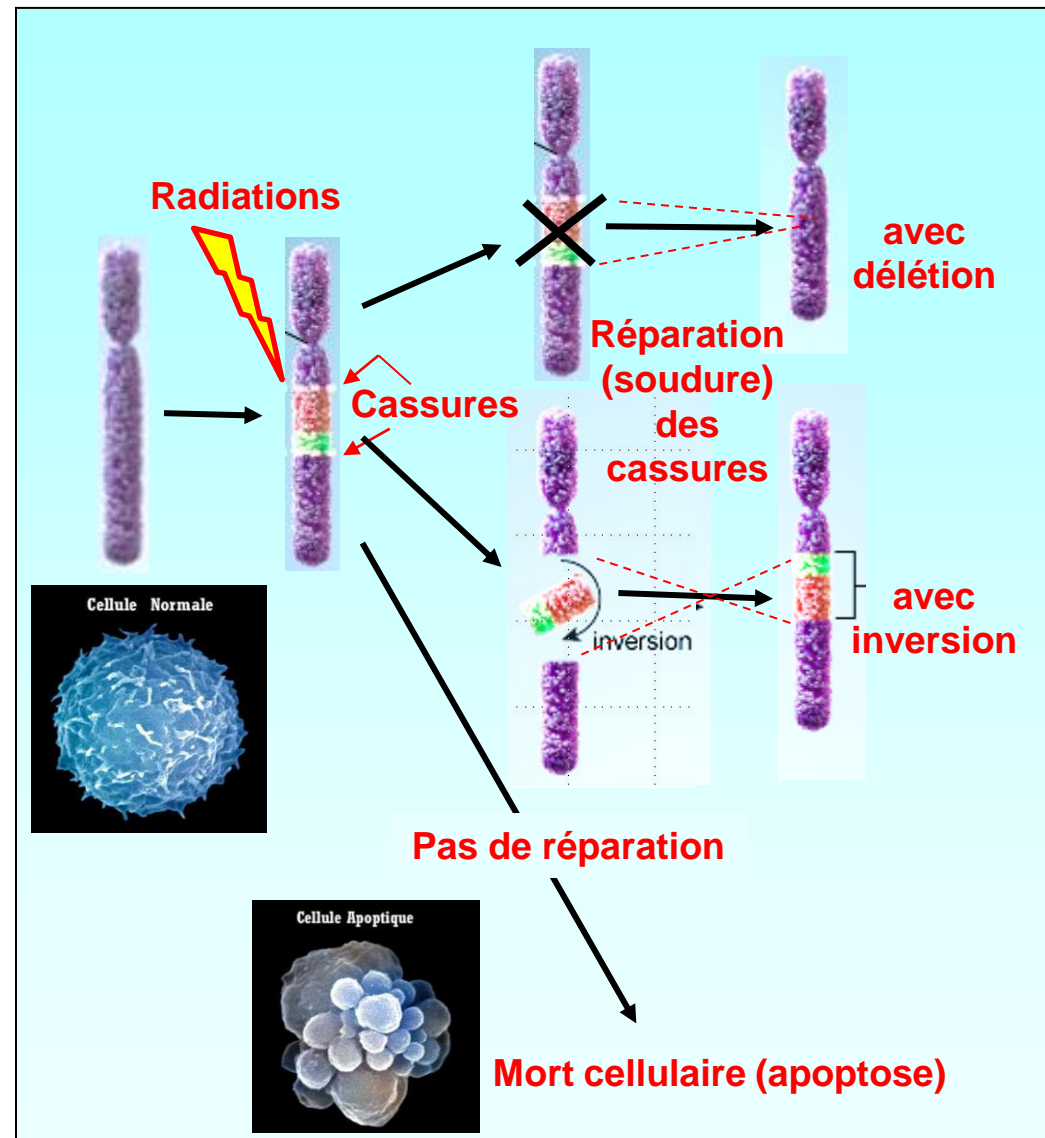




# 1 - Macro-lésions - Mécanismes de formation

## - Exemple de mécanismes d'altération de structure d'un bras de chromosome

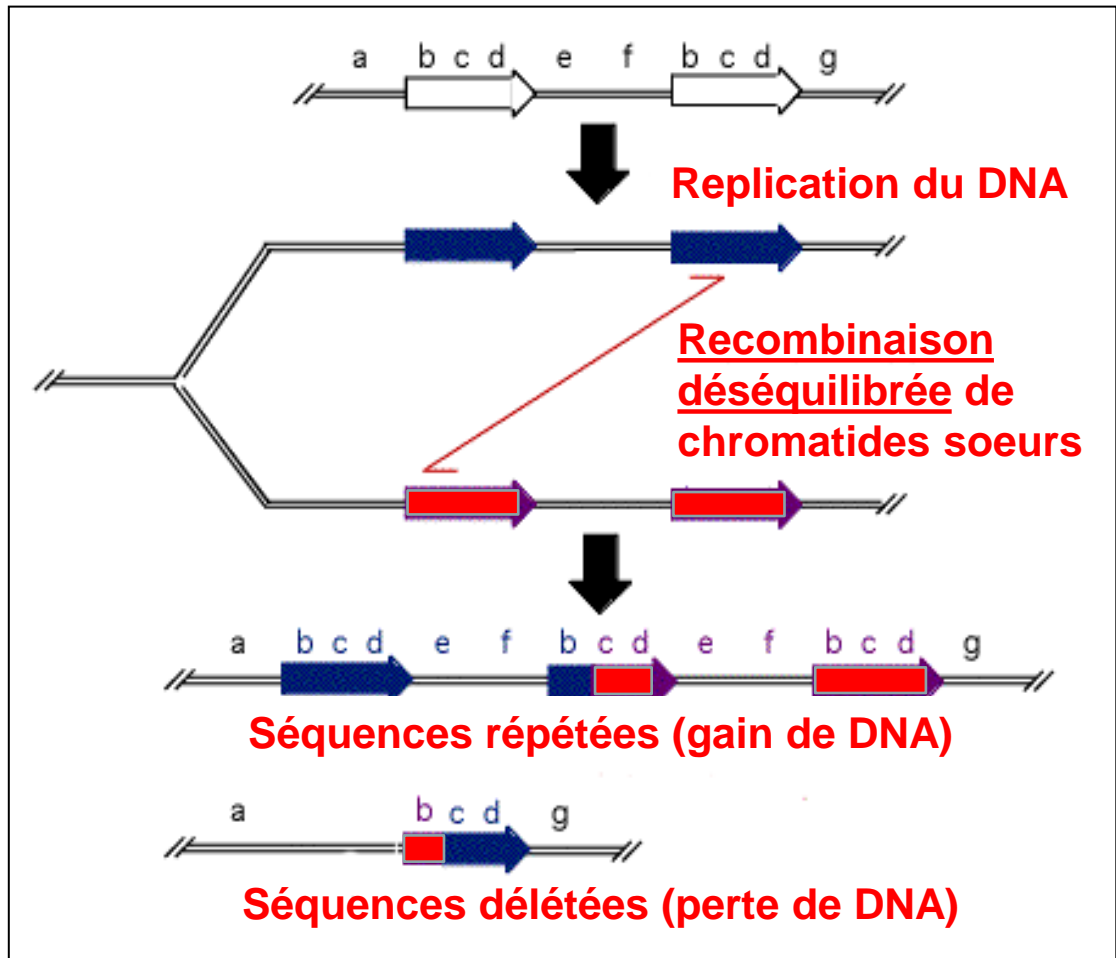
Les agents physiques, chimiques ou biologiques capables de couper les liaisons phosphodiester de la chaîne du DNA (surtout si les coupures concernent les 2 brins) peuvent provoquer des pertes de matériel génétique. Par exemple, l'irradiation de culture cellulaires par des doses relativement importantes de radiations ionisantes peut provoquer des cassures du DNA plus ou moins bien réparées dont les séquelles sont visibles sur le caryotype de ces cellules qui montre des anomalies morphologiques des chromosomes (cassures, délétion avec raccourcissement de bras, allongement de bras avec insertion ou translocation, fusion des extrémités de bras de chromosomes, chromosomes en anneaux, perte de chromosomes..). De plus, beaucoup de ces cellules entrent en apoptose..





# 1 - Macro-lésions - Mécanismes de formation

- Exemple de mécanisme de duplication de grands fragments de DNA par recombinaison déséquilibrée (inégaie) de chromatides sœurs.



Des macro-lésions peuvent aussi survenir au cours des recombinaisons du DNA (particulièrement important au cours de la méiose). Normalement, les recombinaisons homologues (qui permettent le brassage des gènes et des échanges d'allèles entre les chromatides) sont équilibrées et la quantité de matériel génétique échangée est égale. Cependant, parfois accidentellement la quantité de matériel est inégale lors de recombinaisons déséquilibrées entre chromatides sœurs et aboutit d'un côté à un gain (duplication) et de l'autre à une perte (délétion) de matériel génétique. C'est un des mécanismes possibles de duplication des gènes pour constituer des familles de gènes au cours de l'évolution des lignées. C'est aussi un mécanisme pouvant aboutir à des délétions ou des duplications pathogènes en génétique humaine.





## 1 - Macro-lésions - Conséquences fonctionnelles des macro-lésions

Les macro-lésions de très grande taille ont des effets variables. Elles sont généralement associées à des conséquences catastrophiques (pour la cellule ou l'organisme) soit par altération de la structure du génome (pertes de fonctions géniques) ou dysfonction sévères du métabolisme..., soit par induction d'apoptose. La viabilité des cellules présentant ces anomalies est souvent profondément altérée et les conséquences sont souvent léthales pour l'organisme porteurs de ces lésions: les anomalies chromosomiques sévères sont souvent associées à une mort embryonnaire (*in utero*) ou à des anomalies au cours du développement, ou à des maladies génétiques plus ou moins sévères (voir un exemple sur la dia suivante). Plus rarement, certaines macro-lésions sont silencieuses lorsqu'elles affectent une région apparemment non fonctionnelle du génome.

Lorsque ces macro-lésions surviennent dans une lignée somatique, elles peuvent être associées à de graves dysfonctionnements. Par exemples, les lésions induites par les irradiations sévères (par radiations ou par produits chimiques radioactifs) peuvent tuer les sujets en quelques jours, ou à plus faible doses provoquer l'apparition de divers cancers (tumeurs solides ou leucémies).

Des macro-lésions peuvent également être observées dans les cellules de certains cancers (présentant une instabilité génétique sévère, en général de mauvais pronostic).

Les macro-lésions de plus petite taille ont des effets très variables allant d'une absence d'effet (délétion d'une zone non fonctionnelle) à une perte de fonction (délétion de gène). Parfois au contraire, elles peuvent apporter des segments de DNA supplémentaires fonctionnels ou non.





## 2 - Micro-lésions - Mécanisme des formation des micro-lésions

Les micro-lésions du génome sont des lésions du DNA survenant à l'échelle de un à quelques nucléotides jusqu'à un petit segment de gène.

Nous allons prendre des exemples de mutations ponctuelles.

Les mécanismes de formation des mutations ponctuelles sont multiples et nous avons vu dans le cours 'Génome' divers mécanismes pouvant induire des mutations ponctuelles.

- Un premier mécanisme de mutation réside dans la structure même des bases azotées qui existent sous formes de tautomères majeurs et mineurs qui s'interconvertissent (en équilibre). Lors de la réplication, les formes tautomères mineures induisent des appariements différents des formes majeures, donc des mutations (substitutions) dans les brins néoformés qui sont le plus souvent corrigées par la fonction 'proof-reading' des DNA polymérases. Cependant, il persiste des erreurs non corrigées dont le nombre dépend de l'équilibre des tautomères et de l'efficacité du système de correction. Dans les conditions physiologiques, le taux d'erreurs résiduelles est estimé de l'ordre de 1/100 000 000, mais augmente en présence d'agents mutagènes qui modifient l'équilibre des tautomères (ex. bromo-uracile) ou en cas de perturbation (mutation, agents chimiques) de la fonction 'proof-reading' des DNA polymérases.
- Un autre mécanisme peut survenir dans des zones de séquences répétées du DNA, où des 'dérapages' des DNA polymérases peuvent ajouter ou supprimer lors de réplication de courtes séquences répétées.



## 2 - Micro-lésions – Mécanismes de formation des micro-lésions

- Un autre mécanisme perturbant la réplication est induit par des agents mutagènes (agents alkylants, agents oxydants modifiant les bases du brin matrice, agents intercalaires..) qui perturbent l'appariement des bases incorporées lors de la réplication du DNA.
- Des recombinaisons homologues non équilibrées lors de 'crossing-over' peuvent aboutir à la délétion ou à l'insertion de courtes séquences de quelques nucléotides.
- En période post-réplicative, des lésions de l'ADN induites par des agents physiques (radiations ionisantes, UV..) ou chimiques (oxydants..) peuvent induire des modifications des bases du DNA (par exemple désamination oxydative des bases : A → hypoxanthine, C→U, 5MeC→T). Ces altérations du DNA peuvent être corrigées par les systèmes de réparation (dont nous avons vu quelques exemples dans le cours). Cependant les corrections ne sont pas totales et certaines mutations peuvent parfois échapper aux systèmes de réparation (l'efficacité des systèmes de réparation varie considérablement selon les espèces et, au cours de certaines pathologies le déficit de systèmes de réparation est associé à un vieillissement accéléré et à la survenue de cancers.
- Parfois des lésions du DNA altérant les deux brins sont réparées par des systèmes de réparation (par exemple, système SOS des bactéries) qui introduisent des séquences aléatoires (donc mutées) dans le brin 'néoformé...



## 2 - Micro-lésions - structure des micro-lésions

### Exemples des Mutations (ponctuelles)

- **Changement d'une base**
- **Délétion ou insertion d'une (ou quelques) base(s)**

Les micro-lésions du génome sont des lésions du DNA survenant à l'échelle de un à quelques nucléotides jusqu'à un petit segment de gène.

Exemples de mutations ponctuelles.

#### - Changements de bases = substitution

Le changement de base (aussi nommé substitution) au sein du même groupe (purine → purine ou pyrimidine → pyrimidine) est nommé transition, tandis que le changement de base entre les 2 groupes (purine → pyrimidine ou l'inverse) est nommé transversion.

L'analyse combinatoire montre qu'il y a deux fois plus de possibilités théoriques de transversion que de transition, mais l'analyse des variations réelles du génome montre que les transitions sont en général plus nombreuses (à peu près deux fois plus) que les transversions, donc les mutations ne semblent pas totalement aléatoires: par exemple, sur un plan chimique une transition paraît plus facile qu'une transversion...

#### - Délétion ou insertion d'une base: 'indel'

La perte d'un nucléotide (délétion) ou le gain (insertion) est relativement plus rare que les substitutions dans le génome humain puisque les données de la bioinformatique estime le nombre des 'indels' à environ 500 000 (environ 6 fois moins que les substitutions). Le nombre d'indels augmente considérablement en présence d'agents mutagènes intercalaires.

Nb: Le terme 'indel' (contraction de insertion-délétion) désigne un site du génome résultant de l'un de ces événements



## 2 - Micro-lésions – Conséquences des micro-lésions

### Mutations et Variabilité du génome

Les variations de séquence du génome sont décelées par rapport à la 'séquence de référence' du génome humain. En fait, les génomes des individus d'une population donnée présentent une variabilité. Les différences de séquence du DNA nucléaire sont de l'ordre de 3 à 4 millions de nucléotides en moyenne (soit environ 0,1% du génome) entre deux humains non apparentés pris au hasard. Les variations ponctuelles de la séquence d'ADN sont nommées SNP (pour '*single nucleotide polymorphism*' - *polymorphisme d'un seul nucléotide*). Ces variations de séquence du génome nucléaire proviennent de l'accumulation de mutations (souvent silencieuses) survenues (et conservées) au cours de l'évolution de la lignée humaine (associées au brassage du matériel génétique lié à la reproduction sexuée qui permet la dispersion de ces mutations dans la population).

De nouvelles mutations apparaissent en permanence dans la lignée germinale (et sont parfois transmises héréditairement) et dans les tissus de la lignée somatique (ces mutations ne concernent que l'individu et ne sont pas transmises à la descendance).

Pour les mutations affectant le génome mitochondrial de la lignée germinale, il faut se souvenir de la particularité de la transmission du génome mitochondrial qui est transmis uniquement de la mère aux enfants et ne se recombine pas avec le DNA mitochondrial paternel. Les mutations du génome mitochondrial survenant chez le père ne sont donc généralement pas transmises à la descendance (sauf de très rares exceptions découvertes récemment).



## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

Les micro-lésions (mutations ponctuelles, délétions, insertions, inversions..) ont des conséquences fonctionnelles très diverses selon leur localisation et selon leur nature.

- Selon leur localisation dans le génome.

La plupart des micro-lésions survenant dans le génome nucléaire humain semblent silencieuses.

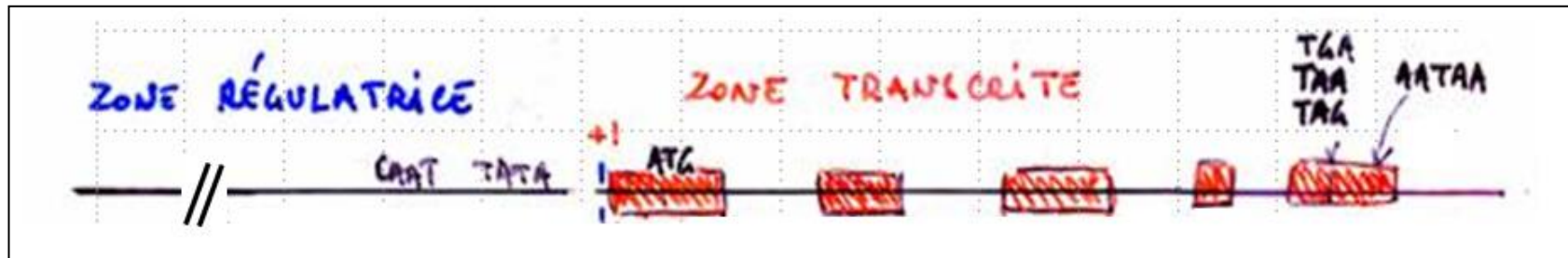
Les **mutations des régions extra-géniques** (ces régions représentent plus de 75% du DNA génomique nucléaire humain et semblent non fonctionnelles, parfois dites 'neutres'). Les mutations survenant dans ces régions sont silencieuses et passent en général inaperçues (sauf dans le cas, rare, d'études moléculaires systématiques du génome global). Ces mutations font partie de la variabilité moléculaire (silencieuse) inter-individuelle du génome.

On peut cependant rappeler que le DNA extra-génique est constitué en grande partie par des éléments génétiques mobiles (ou éléments transposables) qui occupent environ 45% du génome humain. Ces éléments transposables (nous vu l'exemple de la transposition d'une séquence Alu dans le cours) peuvent se déplacer dans le génome et s'insérer dans une zone fonctionnelle du génome (dans un gène par exemple) et perturber son fonctionnement (ainsi il a été montré que certaines transpositions de séquences Alu insérées à l'intérieur d'un gène du génome de la lignée germinale peuvent être cause de maladies génétiques).

## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

Les mutations des régions géniques ont des effets très variables selon la localisation de la lésion dans le gène et selon sa nature.

Nous allons voir quelques effets possibles des micro-lésions (surtout mutations ponctuelles) survenant dans la zone régulatrice et dans la zone transcrite des gènes fonctionnels .



Les gènes contiennent des régions apparemment non fonctionnelles (par exemple, les séquences de DNA reliant les 'box' et les 'éléments de réponse', la majeure partie des introns..). Les micro-lésions affectant ces régions sont en général silencieuses. Rarement, elles peuvent contenir des séquences qui jouent un rôle dans la stabilité du mRNA: dans ce cas, leur mutation peut alors avoir un effet quantitatif sur l'expression du gène).

Rappelons que les pseudogènes (qui par définition ne sont pas fonctionnels) peuvent être modifiés par des mutations, mais ces mutations sont généralement silencieuses (on peut noter que, les pseudogènes ne subissant pas de pression de sélection naturelle, le taux de mutations des pseudogènes est parfois utilisé comme référence du taux de mutation naturel en l'absence de pression de sélection).



## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Mutations (ponctuelles) des zones régulatrices du gène

- Mutation des zones 'neutres'  
(en dehors d'une 'box' ou d'un Elément de Réponse)  
→ pas (ou peu) d'effet
- Mutation d'une 'box' ou d'un Eléments de Réponse  
→ effet quantitatif (expression du gène augmentée ou diminuée)  
(voir détails dia suivante)

Les régions régulatrices des gènes contiennent des régions (séquences) apparemment non fonctionnelles (parfois dites 'neutres'), par exemple des séquences de DNA reliant (et situées entre) les séquences fonctionnelles ('box' et 'éléments de réponse').

Les régions 'neutres' (apparemment non fonctionnelles) des zones régulatrices des gènes subissent des mutations ponctuelles apparemment sans perturbation fonctionnelle du gène et sans conséquence physiologique. Par contre, les mutations survenant dans les séquences fonctionnelles ('box' et 'éléments de réponse') des régions régulatrices perturbent souvent le fonctionnement du gène.



## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

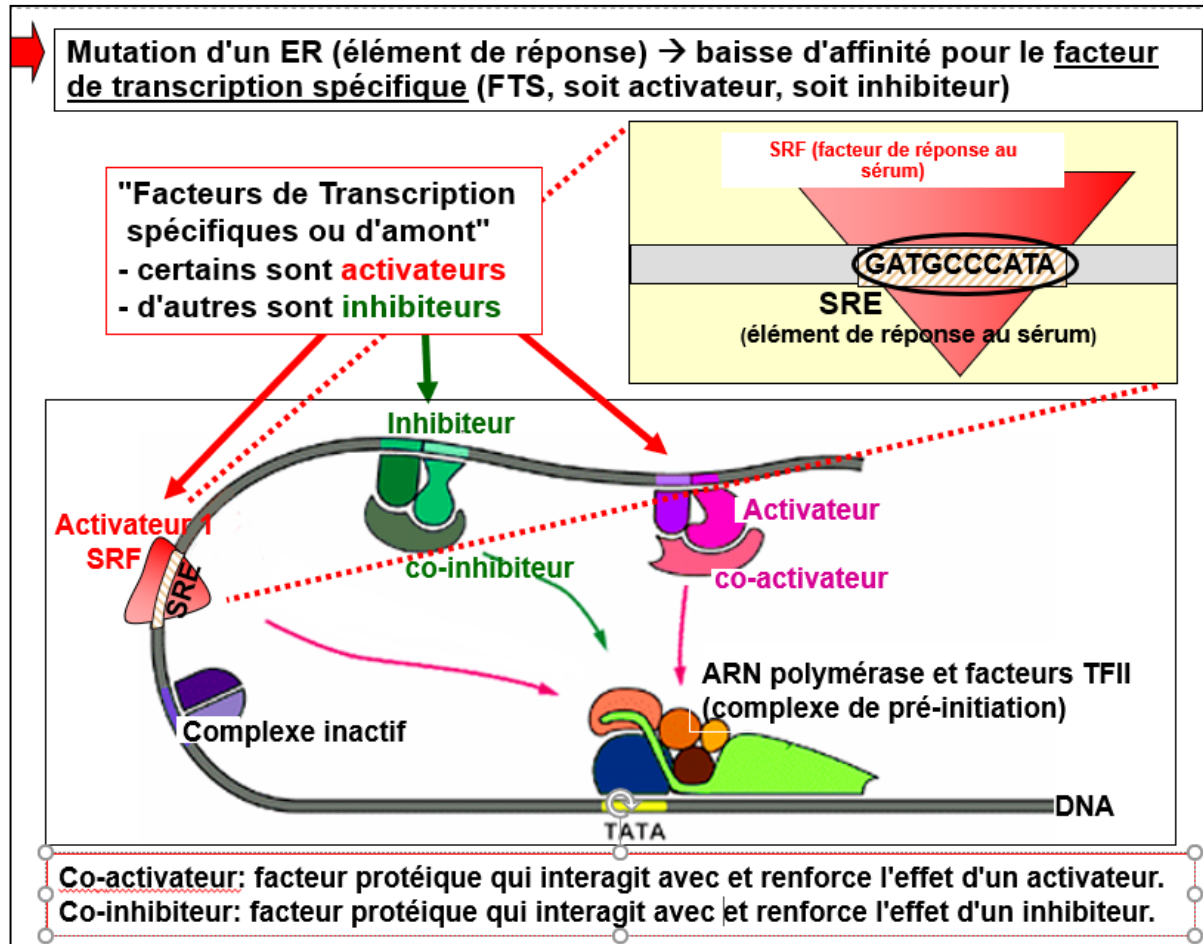
### Les mutations des régions régulatrices des gènes

Nous avons vu que les mutations ponctuelles des régions non fonctionnelles des régions régulatrices des gènes sont généralement silencieuses.

Les mutations des zones fonctionnelles des régions régulatrices du gène affectent en général la fonction du gène, mais ces effets sont très variables. Par exemple, une mutation ponctuelle modifiant la séquence d'une 'box' (TATA, CAAT,..) ou d'un élément de réponse (ER ou RE)

diminue en général l'affinité (cad inhibe la liaison) du Facteur de transcription (FT) pour cette séquence ('box' ou ER). L'inhibition de la liaison du FT a un effet quantitatif sur l'expression du gène, soit diminution, soit augmentation selon le rôle activateur (inducteur) ou inhibiteur (répresseur) de ce FT (l'inhibition de liaison d'un FT activateur induit une diminution de l'expression, alors que l'inhibition de liaison d'un FT inhibiteur induit une augmentation de l'expression génique).

Le schéma ci-contre rappelle le rôle des Facteurs de Transcription (FT) généraux (liés à la 'TATA box') et des FT spécifiques (ou FT d'amont) qui se lient aux séquences de DNA (Eléments de réponse, ER ou RE) et leurs effets régulateurs de l'expression génique.



## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

Les mutations des régions transcrites du gène (qui contiennent les exons et les introns) ont des conséquences fonctionnelles très variables.

Les mutations des introns sont souvent silencieuses, sauf celles modifiant des séquences intervenant dans la 'splicing' (épissage), cad les nucléotides des jonctions exon-intron, et l'adénosine centrale de l'intron qui sert à former le 'lasso'... Des mutations de ces séquences peuvent perturber le 'splicing' et induire des anomalies de l'excision des introns et donc altérer la structure du mRNA mature et de la chaîne polypeptidique synthétisée à partir de ce mRNA.

*Le schéma ci-contre montre quelques anomalies du 'splicing' dues à des mutations des jonctions exons/introns (flèches rouges).*

*La rétention d'intron survient quand l'intron n'est pas excisé et persiste dans le mRNA, ce qui perturbe généralement la structure et la fonction de la protéine.*

*La perte d'exon survient lorsqu'une jonction exon-intron mutée n'est plus reconnues, donc l'exon reste lié à l'introns voisin et est excisé avec lui. Les conséquences dépendent de la fonction de cet exon, mais la protéine amputée est souvent dysfonctionnelle.*

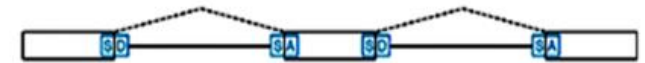
*L'activation d'un site cryptique d'épissage est due à une mutation qui fait apparaître dans un intron une séquence ressemblant à une jonction exon-intron. Ceci induit un épissage dans l'intron et la persistance d'un segment d'intron lié à l'exon voisin, entraînant souvent anomalie structurale et dysfonction majeure de la protéine.*

### Mutations (ponctuelles) dans les zones transcrits non codante

(exemple intron):

- Dans certains cas → pas d'effet
- Dans d'autres cas → perturbation fonctionnelle, par exemple par des mutations dans des zones servant au splicing → anomalie de splicing

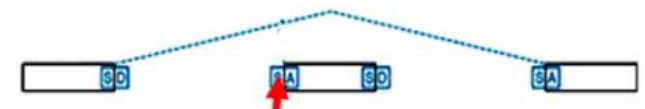
#### Splicing normal



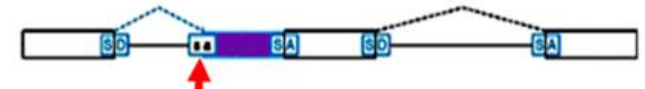
#### Rétention d'intron



#### Perte d'exon ("exon skipping")



#### Activation d'un site cryptique





## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

Les mutations des exons ont des effets très variables.

Les mutations des parties non traduites des exons (en 5' et 3') sont soit silencieuses, soit peuvent parfois perturber la stabilité du mRNA ou l'efficacité de traduction et donc avoir des effets quantitatifs sur l'expression du gène.

Les mutations des codons (cad mutations des parties traduites ou codantes des exons) ont des effets très variables (allant d'une absence d'effet à une perte complète de fonction).

- Les mutations de l'ATG initiateur de la traduction bloquent en général la traduction, donc l'allèle muté est inactivé (pas de synthèse protéique et fonction complètement perdue).
- Les mutations silencieuses des codons sont généralement sans effet sur la structure et la fonction de la protéine. Par exemple, une mutation formant un codon iso-sémantique (ou synonyme) ne change pas l'acide aminé, donc la structure et la fonction de la protéine ne sont modifiées. A noter cependant qu'il existe des exceptions à cette règle: par exemple, certaines mutations de ce type peuvent induire une instabilité du mRNA et donc avoir un effet quantitatif sur l'expression du gène.
- Les mutations non sens (cad codon d'un aa muté en codon stop) induisent un arrêt prématuré de la traduction, donc la synthèse d'une protéine tronquée dont la fonction est généralement perdue ou très altérée.
- Les mutations faux sens (changement de la séquence d'un codon induisant un changement d'acide aminé) peuvent avoir des effets très variables sur la fonctionnalité de la protéine (suite diapos suivantes)

## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Mutations (ponctuelles) dans les zones transcrite et codante

#### Exemple: Changement (mutation) d'une base d'un codon

- Mutations "faux sens" : changement de l'acide aminé
- Mutations non sens (nouveau codon stop) : amputation de la protéine
- Mutations silencieuses : pas de changement de l'acide aminé

Exemples de mutations

#### **Faux sens**

UUA → UCA  
Leu → **Ser**

#### **Non sens**

UUA → UGA  
Leu → **stop**

#### **Silencieuse**

UUA → UUG  
Leu → Leu

AUG initiateur →  
pas de traduction

		Second letter				Third letter
		U	C	A	G	
First letter	U	<div>UUU</div> <div>UUC</div> Phenyl-alanine	<div>UCU</div> <div>UCC</div> <div>UCA</div> <div>UCG</div> Serine	<div>UAU</div> <div>UAC</div> Tyrosine	<div>UGU</div> <div>UGC</div> Cysteine	U
	C	<div>UUA</div> <div>UUG</div> Leucine		<div>UAA</div> <div>UAG</div> Stop codon Stop codon	<div>UGA</div> Stop codon	A
	A	<div>UUG</div> Tryptophan				G
	G	<div>CUU</div> <div>CUC</div> <div>CUA</div> <div>CUG</div> Leucine	<div>CCU</div> <div>CCC</div> <div>CCA</div> <div>CCG</div> Proline	<div>CAU</div> <div>CAC</div> Histidine	<div>CGU</div> <div>CGC</div> <div>CGA</div> <div>CGG</div> Arginine	U
First letter	C			<div>CAA</div> <div>CAG</div> Glutamine		C
	A	<div>CUU</div> <div>CUC</div> <div>CUA</div> <div>CUG</div> Leucine	<div>ACU</div> <div>ACC</div> <div>ACA</div> <div>ACG</div> Threonine	<div>AAU</div> <div>AAC</div> Asparagine	<div>AGU</div> <div>AGC</div> Serine	C
	G	<div>AUU</div> <div>AUC</div> <div>AUA</div> Isoleucine		<div>AAA</div> <div>AAG</div> Lysine	<div>AGA</div> <div>AGG</div> Arginine	A
	U	<div>AUG</div> Methionine; start codon				G
First letter	G	<div>GUU</div> <div>GUC</div> <div>GUA</div> <div>GUG</div> Valine	<div>GCU</div> <div>GCC</div> <div>GCA</div> <div>GCG</div> Alanine	<div>GAU</div> <div>GAC</div> Aspartic acid	<div>GGU</div> <div>GGC</div> <div>GGA</div> <div>GGG</div> Glycine	U
	C			<div>GAA</div> <div>GAG</div> Glutamic acid		C
	A					A
	G					G



## 2 - Micro-lésions – Mutations des codons et conséquences fonctionnelles

### Substitution de Bases

- Transition (même groupe: Pu → Pu ou Py → Py)
- Transversion (groupe différent: Pu → Py ou Py → Pu)

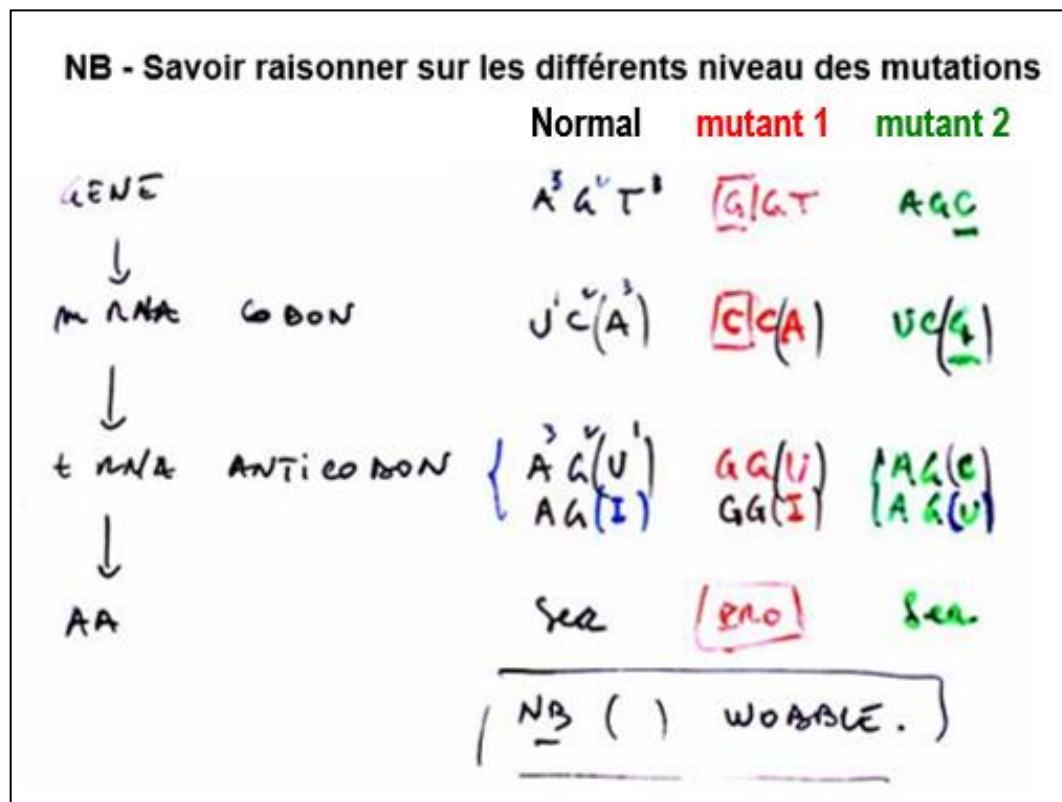
ex. : A → G

ex. : C → A

Cette diapo rappelle quelques définitions concernant les mutations ponctuelles et rappelle que les mutations concernent les trois niveaux du message génétique qui code les protéines chez les procaryotes et les eucaryotes : DNA (gène), mRNA et traduction(tRNA)/protéine.

L'exemple choisi montre un codon initial ('sauvage') modifié par une mutation faux sens (en rouge) aux différents niveaux (gène, mRNA et traduction tRNA/acide aminé) avec l'orientation antisens des séquences qui s'apparient (brin matrice du gène, codon du mRNA, anticodon du tRNA) (appariement codon/anticodon selon les règles du wobble).

En vert est montrée le mécanisme d'une variation induite par une mutation ponctuelle 'silencieuse' du codon (transformé en codon synonyme) qui ne change pas l'acide aminé de la séquence protéique.





## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Les mutations des exons - Mutations faux sens (suite)

- \* Certaines mutations faux sens (induisant un changement d'acide aminé) peuvent avoir peu d'effets fonctionnels (et donc être quasi-silencieuses sur le plan fonctionnel, par exemple quand l'aa originel est remplacé par un aa de structure et de propriétés similaires (par exemple mutations  $\text{Leu} \leftrightarrow \text{Val}$  ou  $\text{Asp} \leftrightarrow \text{Glu}$ )).
- \* A l'opposé, d'autres mutations faux sens peuvent induire des perturbations plus ou moins sévères des fonctions de la protéines. A l'extrême, elles peuvent provoquer une perte de fonction totale ou partielle. Par exemple lors de la mutation d'un aa du site actif d'une enzyme (exemple: la mutation de la sérine du site actif de certaines estérases et protéases induit une perte totale de la fonction enzymatique). Dans d'autres cas, la perte de fonction est partielle ou bien, parfois, la mutation modifie les propriétés physico-chimiques de la protéine: par exemple, dans la drépanocytose ou hémoglobinose S, la mutation  $\text{Glu}(6) \rightarrow \text{Val}$  de *HBB* induit la formation de l'hémoglobine S (HbS est moins stable que l'Hb normale, tend à se polymériser, déforme les globules rouges en faucille, d'où le terme anémie falciforme, et favorise les thromboses).
- \* Parfois, certaines mutations faux sens peuvent aboutir à un gain de fonction pathogène: par exemple, certaines mutations de la PRPP synthétase diminuent la sensibilité de l'enzyme à la rétro-inhibition par l'AMP et GMP, ce qui augmente sa fonction et aboutit à une surproduction de purines qui provoque la goutte.
- \* Les mutations 'faux sens' du codon de terminaison (codon 'stop') induisent un allongement de la protéine (jusqu'au prochain codon stop) avec une altération très variable de la fonction de la protéine (voir diapo suivante).

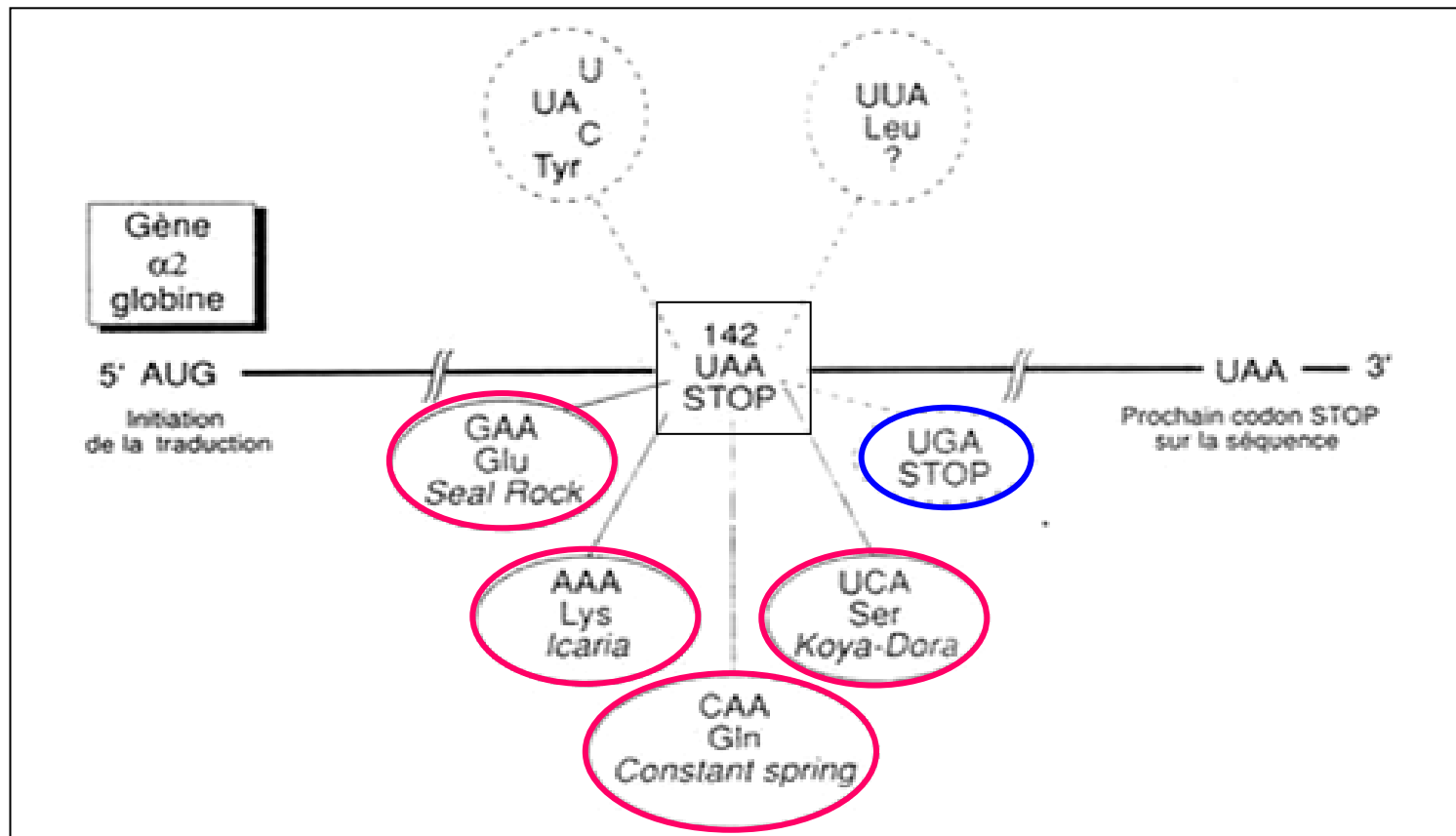
## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Mutations des gènes de la globine

#### - Mutations du codon stop (fin de traduction)

Exemples de mutations du codon stop du gène  $\alpha 2$  de l'hémoglobine

- en bleu mutation isosémantique (pas d'effet)
- en rouge mutation observée (allongement de la protéine)
- en noir pointillé, mutation théorique non observée







## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Les mutations des exons (suite)

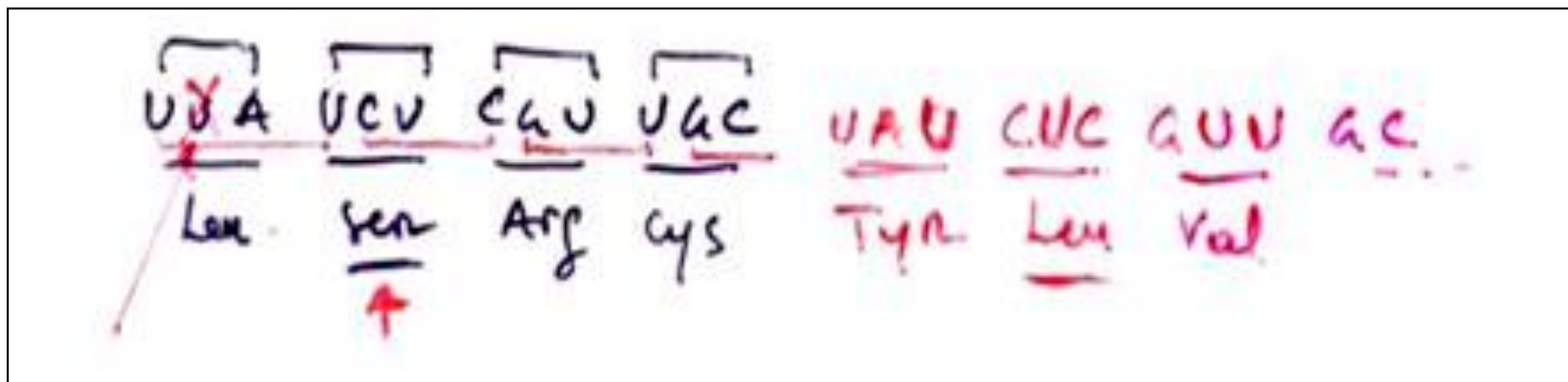
- Les mutations 'frame shift' (induisant un décalage du cadre de lecture) (voir diapo suivante) résultent d'une délétion ou d'une insertion d'un nucléotide (ou de plusieurs nucléotides d'un nombre différent de 3 = codon) dans une séquence codante du génome. Ces mutations induisent un changement de cadre de lecture à partir du codon muté, donc un changement de la séquence du polypeptide (et parfois l'apparition d'un codon stop dans la séquence mutée). En général, ces mutations avec décalage du cadre de lecture altèrent sévèrement la fonction de la protéine.
- La mutation des bases du début et de la fin des exons qui participent à la reconnaissance de la jonction exon-intron (comme les bases de début et de fin d'introns) peuvent perturber la reconnaissance de la jonction exon-intron et l'épissage (voir diapo présentant des exemples d'anomalies de 'splicing').
- La mutation du site de polyadénylation AATAAA peut induire d'une part une diminution de polyadénylation du mRNA, et une diminution de sa durée de vie (puisque la longueur de la queue polyA ralentit la dégradation du mRNA), donc une diminution de l'expression du gène.



## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Mutation "frame shift" (changement du cadre de lecture)

#### Exemple 1 : Délétions ponctuelles (perte d'une base) dans une zone codante

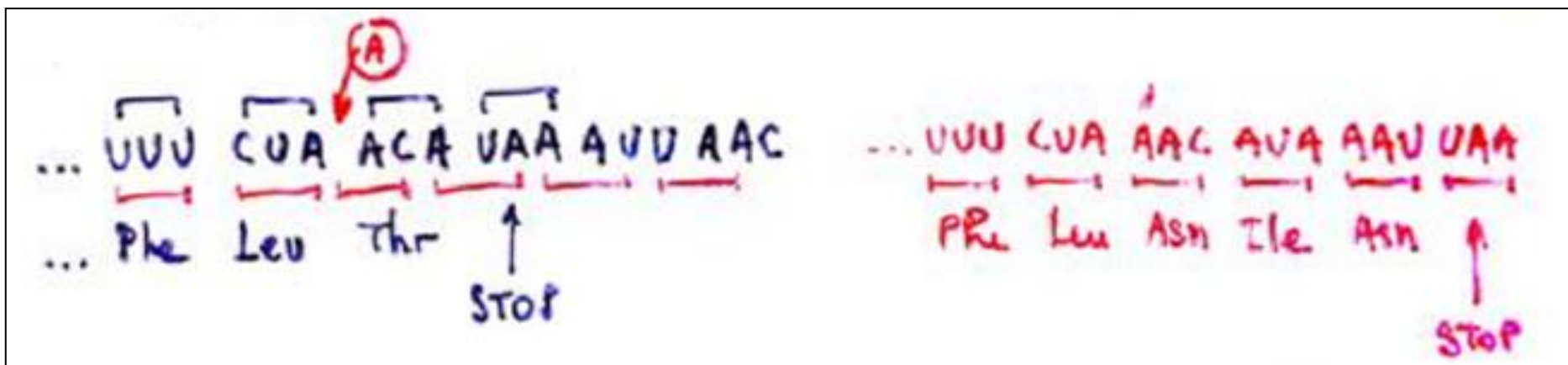


La mutation 'frame shift' (induisant un décalage du cadre de lecture) montrée ici résulte de la délétion ponctuelle du nucléotide à uracile indiqué (2<sup>e</sup> base du premier codon de la séquence du mRNA montrée ici). Par rapport à la séquence non mutée (en noir), le cadre de lecture de la séquence mutée (en rouge) est donc décalé d'une unité et la séquence en acides aminés est complètement changée à partir de ce décalage. La structure de la protéine est donc modifiée et la fonction le plus souvent perdue. Dans certains cas plus rares, une activité résiduelle peut persister, par exemple si la mutation altère la partie distale de la protéine (près de l'extrémité C terminale) et si ce domaine protéique n'a pas de fonction critique pour la protéine.

## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

### Mutation "frame shift" (changement du cadre de lecture)

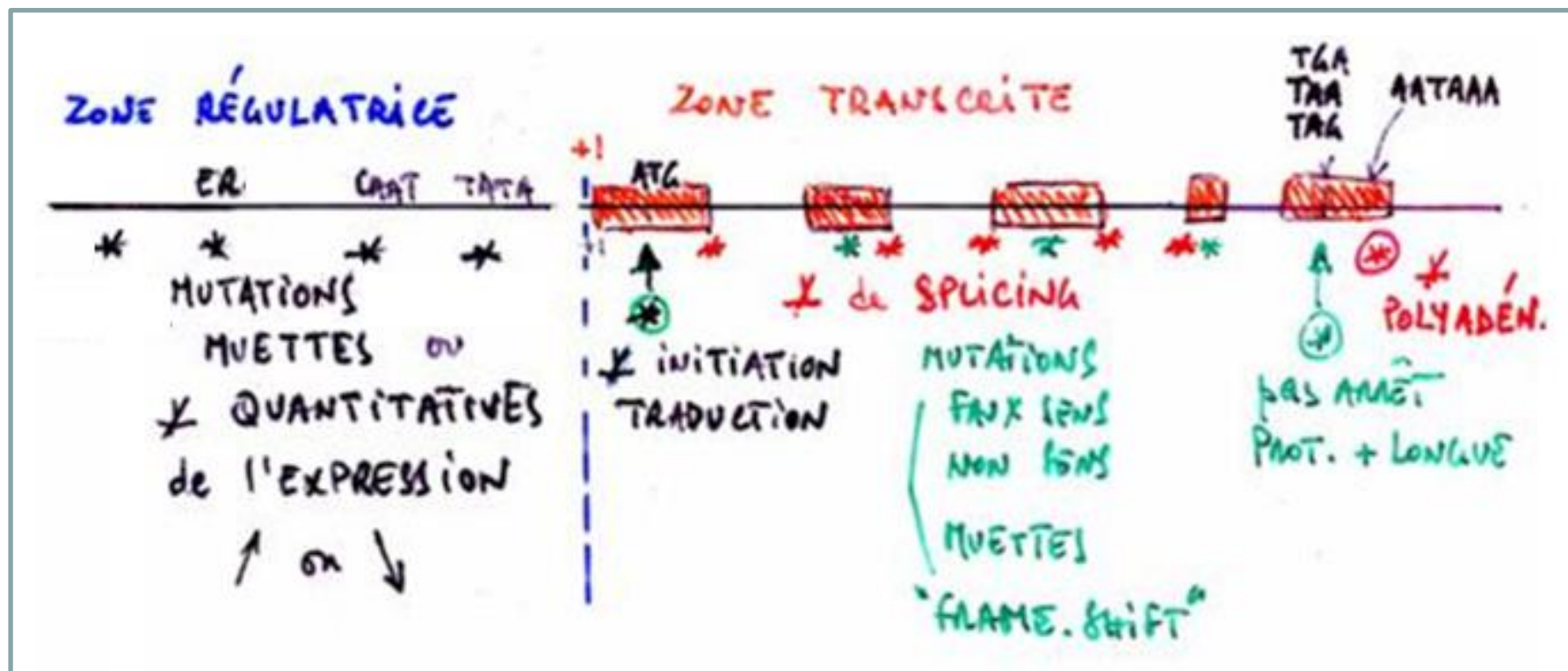
#### Exemple 2 : Insertions ponctuelles (insertion d'une base supplémentaire)



La mutation 'frame shift' (induisant un décalage du cadre de lecture) montrée ici résulte de l'insertion ponctuelle d'un nucléotide à adénine indiquée (à la fin du 2<sup>e</sup> codon ou au début du 3<sup>e</sup> codon de la séquence montrée du mRNA). Par rapport à la séquence non mutée (en noir), le cadre de lecture de la séquence mutée (en rouge) est donc décalé d'une unité et la séquence en acides aminés est modifiée à partir de ce décalage et fait disparaître le codon stop remplacé par un codon sens (ce qui induit donc un allongement de l'extrémité C-terminale de la protéine), jusqu'à l'apparition d'un autre codon stop. Dans cet exemple où seuls quelques acides aminés de l'extrémité C-terminale sont concernés par la mutation, il est possible que l'activité de la protéine soit conservée, par exemple si la structure de l'extrémité C-terminale n'est pas critique pour fonction ou la stabilité de la protéine.

## 2 - Micro-lésions – Types de mutations et conséquences fonctionnelles

Ce schéma d'un gène du génome nucléaire (eucaryote) codant pour une protéine résume les principaux sites de mutations ponctuelles pouvant affecter la région régulatrice et la région transcrite. Les conséquences fonctionnelles des mutations ponctuelles (et des microlésions) des gènes sont très diverses: ces mutations peuvent être 'neutres' (sans effet apparent) ou bien peuvent induire des dysfonctionnements (soit perte, soit gain de fonction) à l'origine de pathologies plus ou moins sévères, et sont parfois léthales pour les cellules ou les organismes qui les portent...



### 3 – Exemples de mutations observées en médecine

Dans les diapos suivantes nous allons voir quelques exemples de mutations (macro-lésions et micro-lésions) observées dans la réalité du diagnostic moléculaire médical. Les exemples de mutations choisis concernent souvent les gènes de l'hémoglobine car les anomalies génétiques connues et répertoriées sont nombreuses pour ces gènes (plus de 500 variants identifiés). Les variations génétiques de l'ensemble du génome humain sont maintenant systématiquement répertoriées et concernent un grand nombre de variants et de maladies génétiques. Les variants et les mutations pathogènes sont collectées dans des bases des données accessibles online \*.

Par exemple la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) créée par Victor A. McKusick (1921-2008) dans les années 60's sous le terme MIM (Mendelian Inheritance in Man, éditions papier) a évolué en 1985 en version informatisée OMIM grâce à la collaboration de la NLM (National Library of Medicine) et de la bibliothèque de l'Université John Hopkins (où McKusick était professeur). Cette base de données OMIM est devenue accessible sur Internet en 1987 et continue à être développée par le NCBI (National Center for Biotechnology Information). Elle répertorie actuellement les variations génétiques, variants normaux et mutations induisant des maladies génétiques, concernant environ 15 000 gènes (chacun pouvant être affecté par diverses mutations).

### 3 – Exemples de mutations observées en médecine

#### **Mutations des gènes de l'hémoglobine : une grande variété de mutations** **- Exemples de Macro-lésions : délétions totale ou partielle des gènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$**

Les deux diapos suivantes montrent des exemples de macro-lésions touchant les régions des gènes de l'hémoglobine qui, dans le génome humain sont localisés sur le chromosome 11 (sous famille  $\beta$ ) et sur le chromosome 16 (sous famille  $\alpha$ ). Ces lésions moléculaires sont causes de thalassémies (voir plus loin une brève description des principales thalassémies).

Les exemples de la diapo suivante montrent des délétions de la région  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (chromosome 16)

- Le 1<sup>er</sup> exemple est simple : la délétion a supprimé la région du gène  $\alpha 1$  (gène  $\alpha 1$  entier et une partie du DNA qui l'entoure), donc cet allèle ayant disparu, il n'y a plus de production ni du mRNA, ni de la protéine (chaîne  $\alpha 1$  de l'hémoglobine) et la fonction de cet allèle est perdue.
- Le 2<sup>e</sup> exemple montre une délétion partielle du gène  $\alpha 1$  (qui supprime environ la moitié C terminale de la protéine) et inactive cet allèle (avec parfois production d'une protéine tronquée inactive car le pli globine est perdu).
- Le 3<sup>e</sup> exemple montre une délétion partielle du gène  $\alpha 1$  (avec perte de l'exon central) qui inactive cet allèle (avec production d'une protéine tronquée inactive, car le pli globine est perdu ou a une structure anormale et la fonction de la protéine est perdue).
- Le 4<sup>e</sup> exemple montre une délétion partielle du chromosome 11 (résultant d'un crossing-over inégal lors de la méiose) supprimant une partie des gènes  $\delta$  et  $\beta$  et le DNA intergénique, avec fusion des deux fragments des gènes délétés ( $\delta\beta$ ). Ce gène de fusion  $\delta\beta^o$  est faiblement exprimé et synthétise une protéine chimère nommée Hémoglobine Lepore (nom d'une famille italo-américaine affectée par cette mutation). Les hétérozygotes sont peu symptomatiques, tandis que les homozygotes ont une symptomatologie plus sévère (anémie hémolytique de gravité variable..), comme les formes majeures des autres  $\beta$ -thalassémies homozygotes.

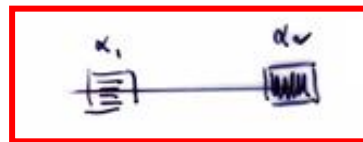
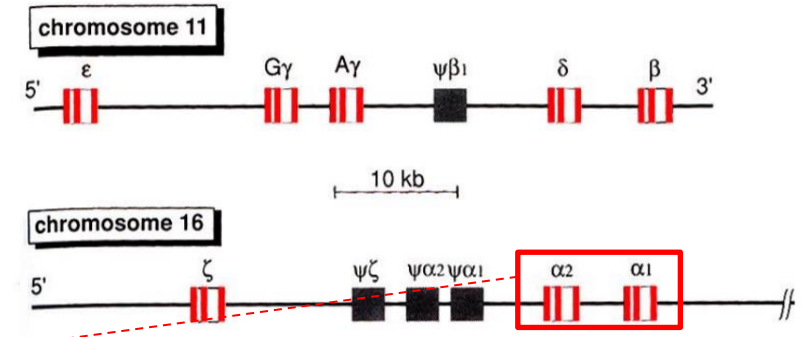


### 3 – Exemples de mutations observées en médecine

#### Mutations des gènes de l'hémoglobine

Exemples de Macro-lésions :  
délétions totale ou partielle des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$

Organisation des gènes et pseudo-gènes sur les chromosomes 11 et 16, chez l'homme



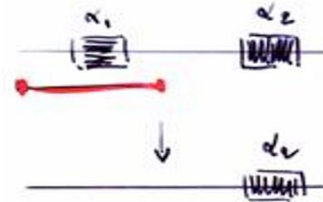
*région  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  normale*

Types de lésion

délétions de la  
région  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$

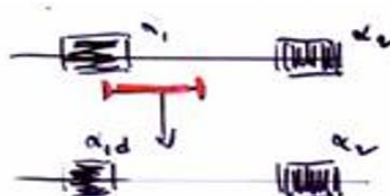
Conséquences biochimiques  
et pathologie

Délétion totale du gène  $\alpha 1$



pas de protéine  
→  $\alpha$ -thalassémie

Délétion partielle du gène  $\alpha 1$



protéine tronquée  
(non fonctionnelle)  
→  $\alpha$ -thalassémie



### 3 – Exemples de mutations observées en médecine

#### Mutations sur les gènes de l'hémoglobine : une grande variété de mutations

##### - Exemples de Macro-lésions

##### Types de lésion

##### Conséquences

Délétion intra-génique  
partielle de  $\alpha 1$

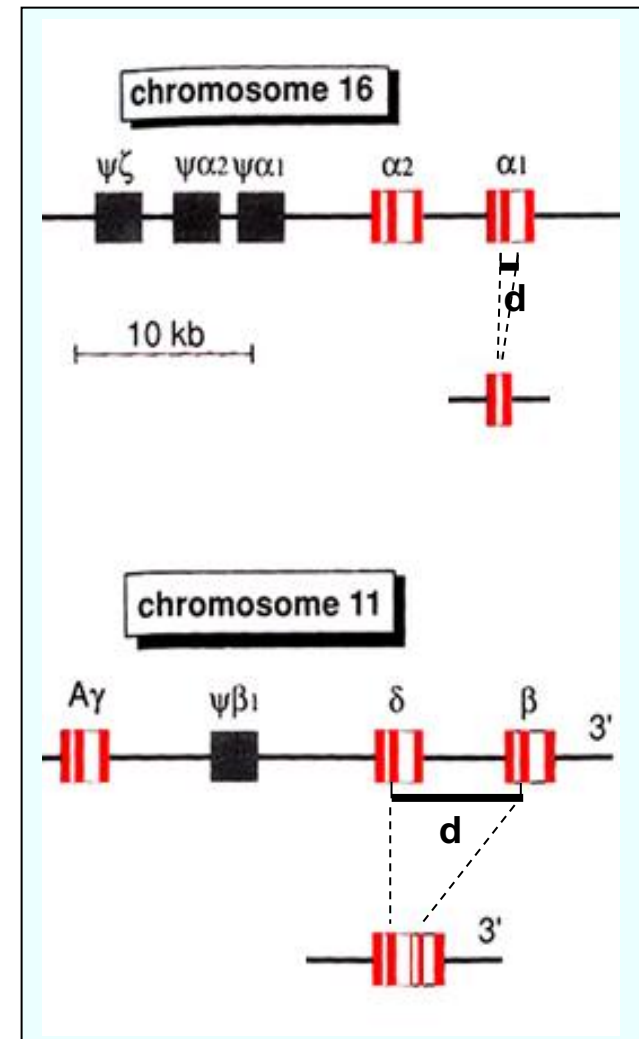
gène non fonctionnel  
→  $\alpha$ -thalassémie

##### Types de lésion

##### Conséquences

Fusion entre  
les 2 gènes  $\delta\beta$

gène faiblement exprimé et  
protéine chimère (Hb Lepore)  
non fonctionnelle  
→  $(\delta\beta)^\circ$  thalassémie



### 3 – Exemples de mutations observées en médecine

#### Quelques notions sur les thalassémies

Les **thalassémies** sont des hémoglobinopathies héréditaires dont les deux principaux groupes,  $\alpha$ - et  $\beta$ -thalassémies, sont dus à des mutations d'un ou plusieurs gènes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'hémoglobine. Ces mutations induisent une perte de fonction du gène muté avec déficit soit quantitatif, soit qualitatif (altération sévère de la structure et de la fonction) d'une chaîne d'hémoglobine.

Les  **$\alpha$ -thalassémies** sont dues à la mutation d'un ou des deux gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  inactivé soit par déficit quantitatif, soit par défaut qualitatif de la chaîne d'hémoglobine codée par ce gène.. Elles sont plus rares que les  $\beta$ -thalassémies et ont des particularités liées à la présence de 4 gènes dans les cellules diploïdes (2 fois  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) qui codent des chaînes  $\alpha$  identiques (de même séquence).

Les effets pathogènes de ces mutations sont proportionnels au nombre de gènes déficitaires. On décrit 4 formes cliniques:

- La '**thalassémie alpha plus**' ou '**silencieuse**', due à la perte de fonction d'un gène  $\alpha$  sur les 4 présents normalement (2  $\alpha 1$  et 2  $\alpha 2$ ), est généralement cliniquement asymptomatique (et associée à une microcytose sans anémie) et compatible avec une vie normale.
- L'**alpha thalassémie mineure** ou 'trait thalassémique', est peu symptomatique (parfois légère anémie) et compatible avec une vie quasi normale.
- L'**alpha thalassémie intermédiaire** ou 'Hémoglobinoïde H', est due à la perte de fonction de trois allèles  $\alpha$  (sur 4), de gravité variable (anémie, splénomégalie, lithiase biliaire.. et anomalie du développement dans les formes sévères à début précoce).
- L'**alpha thalassémie avec 'anasarque fœtale'** ('**hydrops fœtal**') est due à la présence de 4 gènes mutés (double homozygote des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  mutés) et est généralement très grave, souvent mortelle *in utero* ou peu après la naissance.

Les  **$\beta$ -thalassémies**, les plus fréquentes des thalassémies, sont dues à des mutations d'un ou des deux gènes  $\beta$ , qui induisent un déficit (total ou partiel) quantitatif ou qualitatif de l'hémoglobine mutée. La gravité clinique dépend du nombre de gènes mutés (1 ou 2) et de la nature de la mutation (perte totale ou partielle d'activité de l'hémoglobine mutée). On décrit 3 formes cliniques:

- La ' **$\beta$ -thalassémie majeure**' (forme homozygote) dans laquelle le gène  $\beta$  des deux chromosomes est affecté par une mutation induisant une production insuffisante d'hémoglobine fonctionnelle). Les signes cliniques débutent tôt (avant 1 an) associant anémie hémolytique sévère, troubles de la croissance, splénomégalie, sensibilité aux infections... Cette forme nécessite des transfusions sanguines (chaque mois) qui provoquent une surcharge en fer progressive (hémochromatose avec complications cardiaques).
- La ' **$\beta$ -thalassémie intermédiaire**' (forme homozygote) est due à la mutation du gène  $\beta$  des deux chromosomes, avec conservation d'une activité résiduelle produisant une quantité faible d'hémoglobine partiellement fonctionnelle. Les symptômes sont moins sévères que dans la forme majeure, avec un début plus tardif et une anémie mieux tolérée nécessitant moins de transfusions.
- La ' **$\beta$ -thalassémie mineure**' (forme hétérozygote), due à la mutation d'un seul gène  $\beta$  sur les 2 présents normalement, est généralement cliniquement peu symptomatique (pas d'anémie ou anémie modérée, microcytose).

Il existe d'autres types de thalassémies plus rares.

### 3 – Exemples de mutations observées en médecine

#### Micro-lésions des gènes de l'hémoglobine: une grande variété de mutations

Exemples de micro-lésions (souvent mutations ponctuelles) des gènes  $\beta$  de l'hémoglobine, des conséquences moléculaires et des pathologies associées. Les divers types de mutations prédites par les modèles moléculaires théoriques existent dans la réalité: mutations de la région régulatrice (promoteur), mutations des régions transcrites et traduites... A noter que les mutations qui affectent le 'splicing' du mRNA induisent non seulement des anomalies du mRNA mature (vu plus haut) mais aussi une instabilité (et parfois une absence) de ce mRNA. Par ailleurs, il existe d'autres types de mutations induisant une instabilité des mRNA.

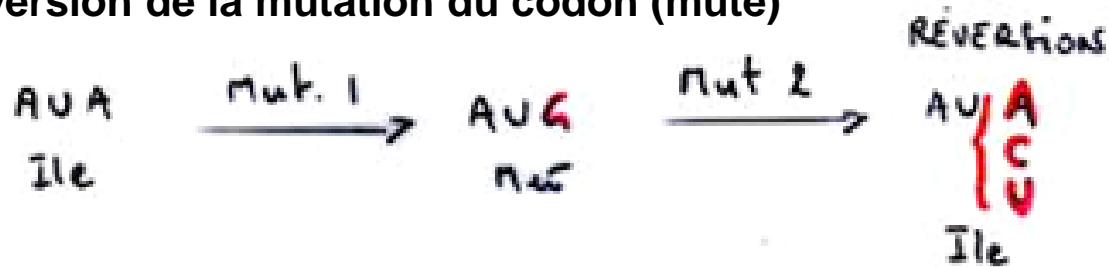
Type de microlésions	Conséquences moléculaires	Phénotype (pathologie)
Mutation ponctuelle faux sens	protéine anormale	Hb S ( <u>hémoglobinose S</u> ) *
Mutation non-sens	gène non exprimé	$\beta$ -thal <sup>°</sup> 39
Mutation « frame-shift »	gène non exprimé	certaines $\beta$ -thal <sup>°</sup>
Mutation codon d'initiation ou de terminaison	gène non exprimé	
Mutation promoteur	expression diminuée	certaines $\beta$ -thal <sup>+</sup>
Mutation affectant la maturation du mRNA :		
1. à un site d'épissage (donneur ou accepteur)	mRNA absent	certaines $\beta$ -thal <sup>°</sup>
2. création d'un nouveau site d'épissage dans un intron	mRNA diminué ou aboli	certaines $\beta$ -thal <sup>+</sup> et $\beta$ -thal <sup>°</sup>

\* Les **hémoglobinoses** sont des hémoglobinopathies (maladie héréditaire de l'hémoglobine) dues à une mutation (en général faux sens) d'un gène de l'hémoglobine induisant une anomalie structurale d'une chaîne de globine et une anomalie fonctionnelle (par exemple anémie hémolytique. Les plus fréquentes sont les hémoglobinoses S, C, E...)

## 4 – Réversion des mutations ponctuelles

La réversion d'une mutation ponctuelle (qui modifie la séquence d'une protéine et altère sa fonction) est due à une 2<sup>ème</sup> mutation qui rétablit la séquence protéique initiale fonctionnelle de la protéine. Ces mutants 'réversés' sont parfois désignés sous le terme 'révertants'.

### 1 – Réversion de la mutation du codon (muté)



Dans le cas le plus simple de réversion, une 1<sup>ère</sup> mutation transforme le codon natif ou 'sauvage' en codon muté et la réversion est due à la survenue d'une 2<sup>ème</sup> mutation qui transforme ce codon muté en codon muté une 2<sup>ème</sup> fois (re-muté) identique ou synonyme du codon initial, ce qui permet d'obtenir à nouveau la séquence protéique initiale.

Dans l'exemple ci-dessus le codon natif ou 'sauvage' AUA qui code pour Ile est muté par une 1<sup>ère</sup> mutation A→U en AUG qui code pour Met. La réversion peut être réalisée par une 2<sup>ème</sup> mutation qui change le G du codon muté en A, C ou U, donc génèrent un codon re-muté (AUA, identique au codon 'sauvage' ou AUC ou AUU codons synonymes – voir code génétique) qui mettent en place Ile, donc restaurent la séquence protéique initiale.

La réalité de ce phénomène de réversion a été observée expérimentalement d'abord sur les bactéries (en étudiant des mutants d'enzyme de voies métaboliques de biosynthèse d'acides aminés et les 'révertants', bactéries mutantes retrouvant le phénotype initial grâce à une 2<sup>ème</sup> mutation).

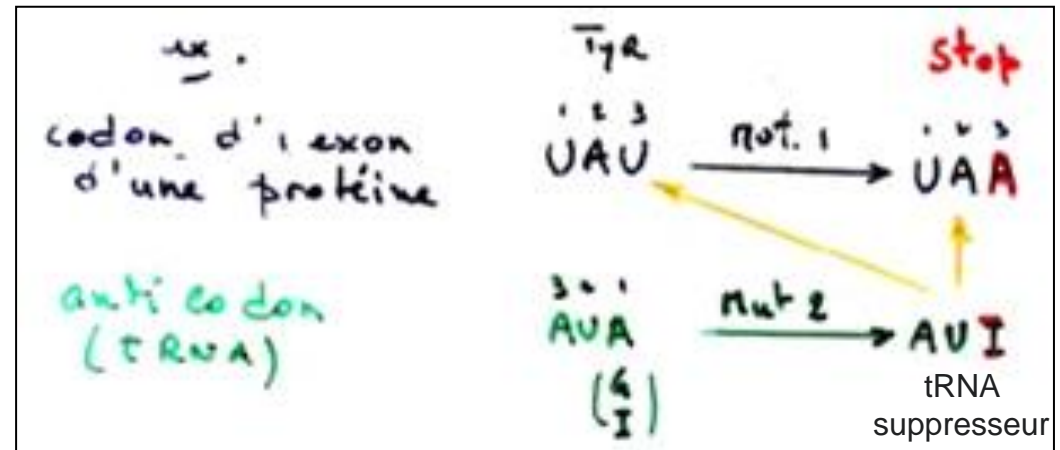
On peut noter que ces études permettent de vérifier l'existence des codons synonymes, conformément au code génétique.

## 4 – Réversion des mutations ponctuelles

### - Cas particulier des tRNA supprimeurs (bactéries)

Il existe un autre mécanisme de réversion d'une mutation ponctuelle médiée par des tRNA supprimeurs. Ce phénomène a été observé pour la réversion de certaines mutations ayant fait apparaître un codon stop (et dont la réversion n'était pas due à une 2<sup>ème</sup> mutation du même codon) (mécanisme décrit sur la diapo précédente).

Dans l'exemple ci-contre, une 1<sup>ère</sup> mutation non sens transforme un codon UAU de Tyr en codon stop UAA qui induit la formation d'une protéine tronquée inactive. On observe la survenue de 'révertants' dont le codon muté (par la première mutation) reste inchangé et dont la réversion est liée à un tRNA suppresseur. Dans le cas de l'exemple choisi, un tRNA de Tyr dont l'anticodon AUA est muté en IUA peut s'apparier au codon stop UAA (selon les règles du wobble) et incorporer une tyrosine levant ainsi le blocage de la traduction dû à la mutation non sens et permettant de poursuivre la synthèse de la protéine.



Cependant, ce type de réversion donne souvent des 'révertants' de faible viabilité, car le tRNA suppresseur qui s'apparie au stop n'est pas forcément celui de l'acide aminé initial (donc la protéine réversée peut avoir une structure modifiée, de type faux sens) et d'autre part les signaux stop d'autres protéines peuvent être 'effacés' par le tRNA suppresseur (donc d'autres protéines peuvent être rallongées, et parfois dysfonctionnelles)... Dans les conditions expérimentales (utilisant un puissant système de sélection pour une caractéristique phénotypique choisie) ces 'révertants' sont détectés, mais ont souvent des dysfonctionnements de leur physiologie qui les feraient disparaître dans les conditions de vie normale (très compétitives) des bactéries qui sont soumises en permanence à la sélection naturelle.

**Fin du chapitre : Mutations**