

Gwendal Le Martelot

**Objectifs généraux :** Connaître et identifier les mutations génétiques et naviguer sur des sites internet couramment utilisés par les chercheurs. Ce travail pourrait être un TP qui viendrait en soutien du cours de génétique.

A travers cette petite mise en situation, j'ai cherché à sensibiliser les élèves sur les mutations génétiques qui surviennent lors d'un cancer et sur un test de routine de laboratoire de médecine génétique de l'hôpital. Exemple de *la leucémie myéloïdes aigues LMA*.

**Classe concerné :** L'exercice est relativement complexe et devrait concerner des élèves de fin de 3<sup>ème</sup> OS voir 4<sup>ème</sup> OS.

**Les connaissances pré-requises** suivantes sont nécessaires pour bien appréhender cette séquence de travail : savoir ce qu'est une mutation, savoir ce que sont les exons et les introns, connaître ce qu'est la traduction et le code génétique (notion de codon), PCR, séquençage Sanger.

**Production attendue** (travail en groupe de 2 ou 3)

- Au cours de l'exercice, les élèves doivent répondre à des questions courtes qui permettent de les orienter et leur faire savoir s'ils sont sur la bonne voie.
- En fin de séance, ils pourraient rédiger un rapport plus construit qui reprendrait dans sa globalité les différents points de cette séance. Les instructions pour la rédaction du rapport pourraient être assez générales afin que l'enseignant puisse évaluer de façon formative ce que les élèves ont retenu de ce travail.

**Objectifs spécifiques :**

POINT 1 : Prise de connaissance sur les leucémies myéloïdes aigues grâce à la lecture du document « information patient » distribué en France aux patients nouvellement diagnostiqués pour cette maladie. Mise en contact avec le réel.

POINT 2 : Trouver une publication scientifique grâce à PubMed.

POINT 3 : Extraire des informations (liste de gènes) d'une lecture scientifique. Dans cet exemple, les élèves peuvent utiliser un commentaire de l'article (qui est lié à la référence PubMed) qui est plus digeste que l'article lui-même. L'information demandée est présente dans les premières lignes du commentaire ainsi que dans un tableau. Accès facile à l'information.

POINT 4 : Trouver de l'information concernant ces gènes sur des sites spécialisés tout comme le feraient des scientifiques (jeu de piste guidé avec des questions).

Savoir ce que sont les mutations de type : substitution synonyme et non synonyme, non-sens, insertion, délétion.

Comprendre pourquoi certaines mutations peuvent avoir des conséquences lourdes sur l'activité de la protéine (exemple des insertions *out-of-frame*, exemple de la mutation D835 dans le domaine tyrosine kinase de FLT3)

POINT 5 et 6 : exercices de réflexion

Savoir qu'elles sont les conséquences d'une insertion/délétion sur le code de lecture et sur la

protéine. Connaître un test de routine de laboratoire et comprendre ses limites (et essayer de l'améliorer).

Petite mise en scène de l'histoire

Vous êtes un jeune hématologue des HUG et en 2011 vous assistez à la conférence annuelle de la société américaine d'hématologie à San Diego. En fin de journée, le professeur Chen SJ de Shanghai présente les travaux de son équipe qui portent sur l'analyse des gènes les plus fréquemment mutés dans les leucémies myéloïdes aiguës\* (LMA ou AML en anglais pour acute myeloid leukemia). Son travail vous intéresse ; malheureusement après toutes les conférences de la journée votre cerveau est en surcharge et vous finissez par vous assoupir... Vous lirez les résultats de ses recherches dans l'article qu'il vient récemment de publier (2011) dans la revue *Blood*.

\*Ce cancer survient lorsque des mutations génétiques de différentes natures s'accumulent au niveau des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (1% des cellules environ chez un sujet sain). Ces cellules peu différenciées, qui ont accumulé ces mutations, prolifèrent de façons excessives et passent de la moelle osseuse dans la circulation sanguine. Ainsi, chez les patients souffrants de LMA il est fréquent de retrouver dans le sang plus de 80% de cellules peu différenciées (cellules blastiques cancéreuses) ! Dans un tel scénario les globules rouges, qui représentent l'essentiel des cellules sanguines chez un sujet sain, sont extrêmement diminués.

1) Pour en savoir plus sur cette maladie :

[www.hematologie.net](http://www.hematologie.net) site internet de la société française d'hématologie. Fiche « information patient » donnée aux personnes récemment diagnostiquées pour cette maladie (en France).

[http://hematologie.net/hematolo/UserFiles/File/PDF/Leucemieaigue\\_myeloide.pdf](http://hematologie.net/hematolo/UserFiles/File/PDF/Leucemieaigue_myeloide.pdf)

2) Retrouver l'article et son commentaire sur le site PubMed qui référence les publications scientifiques. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

3) Selon cet article (et surtout selon le commentaire) quels sont les gènes les plus fréquemment mutés et dans quelles grandes catégories de fonction peuvent-ils être classés.

4) En vous aidant de la base de données COSMIC (catalogue of somatic mutation in cancer) que pouvez vous dire sur :

a- la distribution des mutations qui affectent les gènes FLT3, RUNX1 et CEBPA

<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>

> écrire le nom du gène dans la boîte de dialogue qui apparaît en milieu de page

> cliquer sur le nom du gène ou sur le premier lien qui se termine par

.../gene/overview

> cliquer à droite sur « Mutation analysis, Histogramme »

b- quel est la mutation la plus fréquente dans le gène FLT3, dans quelle région particulière de la protéine se situe-t-elle.

c- la nature des mutations (mutation ponctuelle, insertion, délétion) qui affectent RUNX1 et CEBPA

<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>

> taper le nom du gène

> cliquer sur le nom du gène ou sur le premier lien qui se termine par

.../gene/overview

> cliquer à droite sur « Mutation analysis, Distribution »

5) Les mutations qui affectent le gène CEBPA sont souvent des insertions et/ou des délétions. Que se passe-t-il pour le transcrit (ARNm) et la protéine, si il y a une insertion ou une délétion de 1pb, 2pb ou 3pb dans un exon.

6) Connaître les gènes qui sont mutés ainsi que la nature des mutations sont d'une très grande importance car cela influence la nature du traitement. Par exemple, les mutations qui affectent le gène FLT3 conduisent à des LMA très agressives pour lesquelles une greffe de moelle chez le patient est souvent requise. Afin de savoir si les patients que vous recevez ont la mutation D835, vous décidez de séquencer par la méthode de Sanger l'exon X où se trouve cette mutation. Pour cela vous amplifiez par PCR cet exon à partir de l'ADN génomique extrait d'un prélèvement de sang du patient que vous souhaitez tester. Ensuite, vous envoyez le produit de PCR au centre de séquençage de l'hôpital.

La technique de Sanger a un pouvoir de résolution limité que l'on estime aux alentours de 20%. C'est-à-dire que vous ne pourrez pas détecter par séquençage un « variant » qui est minoritairement représenté dans votre produit de PCR (moins de 20%).

Si la mutation n'affecte qu'un seul des deux allèles, est-ce que vous pensez trouver cette mutation si votre échantillon de sang contient 20% de cellules cancéreuse\*. Estimez le pourcentage minimum de cellules cancéreuses pour que vous puissiez la détecter par la méthode de Sanger. Dans ces calculs doit-on prendre en compte les globules rouges.

Vous recevez un échantillon de sang dans lequel figure 10% de cellules cancéreuses, que feriez-vous pour améliorer le protocole classique (extraction d'ADN génomique de toutes les cellules de l'échantillon de sang, PCR sur la région qui contient la mutation, séquençage Sanger du produit de PCR) afin que vous puissiez trouver cette mutation. Exemple de réponse attendue : essayer de purifier les cellules cancéreuses afin de les enrichir (concentrer) avant de faire l'extraction d'ADN génomique.

\*on suppose que la population de cellules cancéreuses est clonale et qu'elles ont toutes la mutation D835.

D'autres questions pourraient bien sur être demandées.