

Enseignement de Génétique DCEM2

Indications et méthodes de l'analyse de l'ADN pour le diagnostic des maladies génétiques

Dr Eric Leguern

Département de Génétique; Université Paris VI; UMR U679; GH Pitié-Salpêtrière, Paris

INDICATIONS DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

- ◆ 2 types de maladies:

- Maladies héréditaires, monogéniques, à transmission mendélienne (« rares »):

intervention d'une mutation dans un seul gène

- maladies à hérédité complexe, multifactorielles, polygéniques (« fréquentes »)

intervention de plusieurs gènes en interaction entre eux et avec l'environnement.

LES INDICATIONS DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

- ◆ Le diagnostic positif:
 - Recherche d'une mutation chez un sujet atteint
 - diagnostic différentiel (+++ en neurologie);
 - formes de début, formes frustres;
 - En vue d'un diagnostic prénatal, dans le cadre d'un conseil génétique
- ◆ Le conseil génétique: recherche d'hétérozygote pour les conjoints de porteur pour les maladies fréquentes (risque pour le couple d'avoir un enfant atteint)
- ◆ Le diagnostic prénatal: maladie grave à début précoce
 - **Mucoviscidose;**
 - Amyotrophie spinale;
 - Myopathie de Duchenne...
- ◆ Le diagnostic présymptomatique: maladie à révélation tardive
 - **Formes familiales de cancer (BRCA1; BRCA2);**
 - Maladie de Huntington;
 - Formes familiales de cardiopathies,

LE DIAGNOSTIC POSITIF

LA DEMARCHE DU CLINICIEN (1)

- ◆ Définir le phénotype du cas index:
 - Éléments cliniques;
 - Examens paracliniques;
 - Evolution.

- ◆ L'arbre généalogique:
 - Utiliser les symboles « officiels »;
 - Mettre le nom et le prénom de tous les individus représentés;
 - Leur date de naissance (ou l'âge);
 - Indiquer ceux qui ont eu un prélèvement (*)
 - Indiquer les personnes décédés.

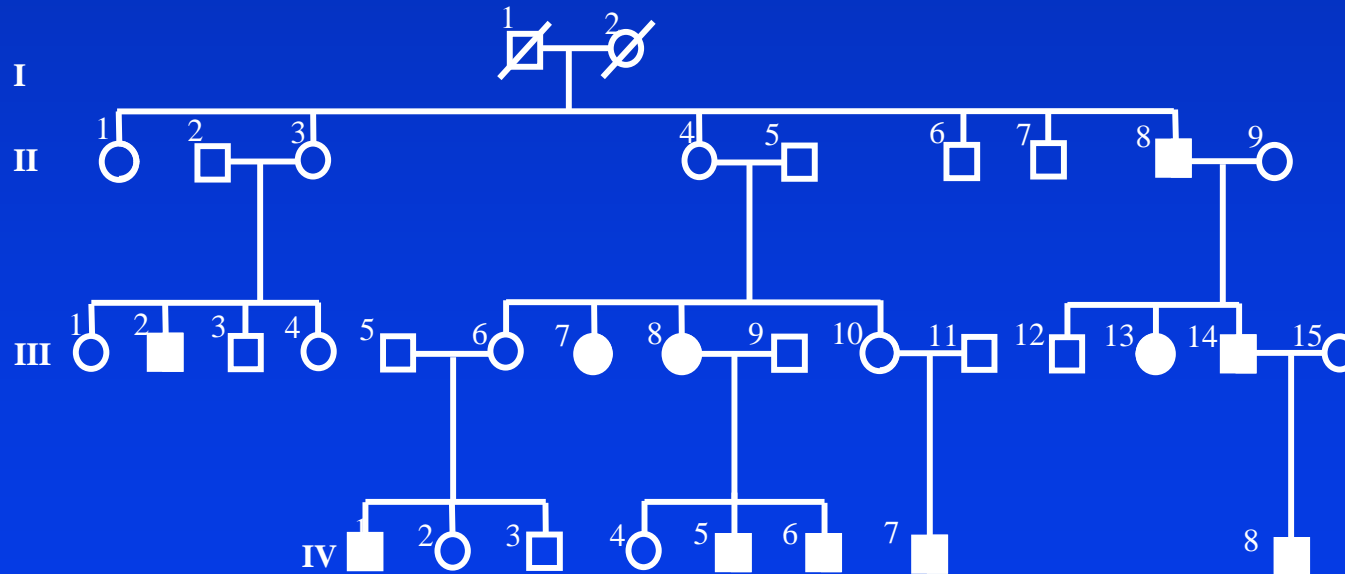
LA DEMARCHE DU CLINICIEN (2)

- ◆ Le prélèvement de sang veineux doit être envoyé au laboratoire:
 - Après information au patient avec **signature d'un consentement**
 - ✓ Nom de la maladie;
 - ✓ Responsable du prélèvement avec ses coordonnées;
 - ✓ Signature du patient;
 - ✓ Signature du médecin responsable.
 - Avec la fiche de demande diagnostique remplie;
 - Avec la photocopie du consentement;
 - Toujours associé à un dossier clinique ou une synthèse.
- 1 à 2 tubes de 7 ml de sang sur EDTA.
- **<48 h** au laboratoire (par poste rapide)

LES QUESTIONS (1a)

◆ Quel est le mode de transmission ?

- Autosomique dominant, dominant ou récessif lié à l'X
 - ✓ Neurofibromatose (AD);
 - ✓ Maladie de Marfan (AD);
 - ✓ Myopathie de Duchenne (RX);
 - ✓



1 seule mutation à identifier

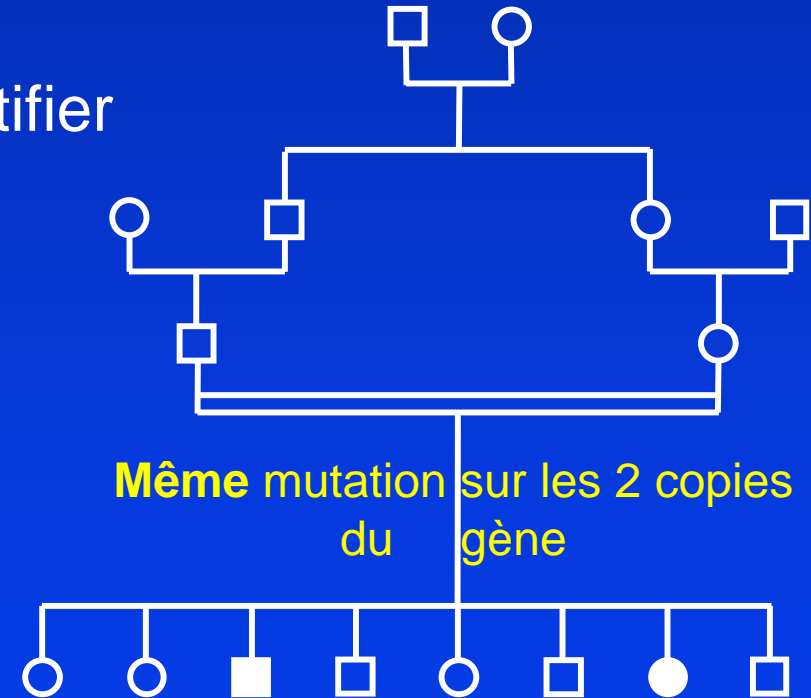
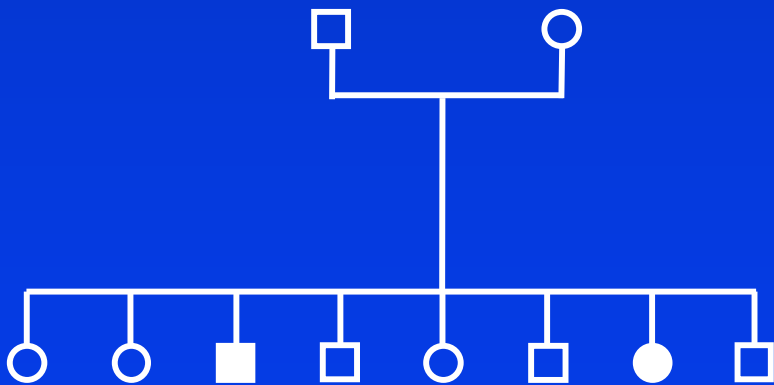
LES QUESTIONS (1b)

◆ Quel est le mode de transmission (2)?

➤ Autosomique récessif:

- ✓ Mucoviscidose;
- ✓ Phénylcétonurie;
- ✓ Déficit en 21-OH;
- ✓

2 mutations à identifier

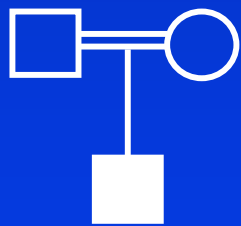
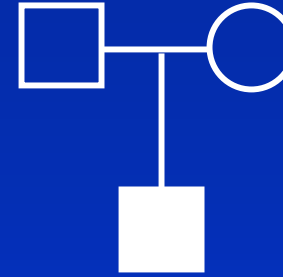


LES QUESTIONS (1c)

LE PROBLEME DES CAS ISOLES:

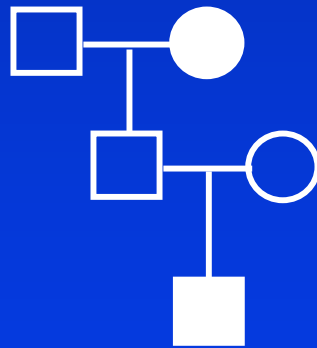
Très fréquents en France:

- fratrie de petite taille;
- perte de la mémoire familiale;
- pathologie cachée dans les familles.:



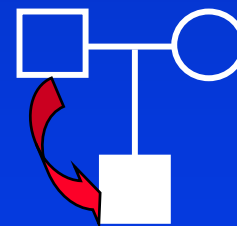
$$R \rightarrow 0$$

AR



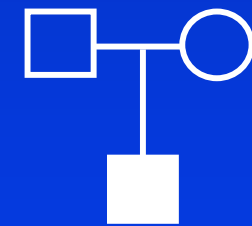
$$R = 0,50$$

AD



$$R = 0,50$$

Mutation de novo



$$R = 0$$

Phénocopie

LES QUESTIONS (2a)

◆ Hétérogénéité génétique ?

Quand une maladie génétique peut être due à des mutations dans des gènes différents.

➤ NON

- ✓ Mucoviscidose;
- ✓ Myopathie de Duchenne;
- ✓ Phénylcétonurie;
- ✓

1 seul gène à analyser

LES QUESTIONS (2b)

◆ Hétérogénéité génétique ?

➤ OUI

- ✓ Hémophilie (A et B), mais l'activité FVIII et FIX permet d'orienter l'étude;
- ✓ Neurofibromatose;
- ✓ Formes familiales de cancer du sein (BRCA1 et BRCA2);
- ✓

• Plusieurs gènes à analyser (délai des résultats);

• Tous les gènes sont-ils connus ?

NON: Quelle est la proportion de familles pour lesquels on a trouvé une mutation dans les gènes connus?

Pour avoir accès à ce type d'informations :

Online Mendelian Inheritance in Man

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

LES QUESTIONS (3a)

◆ Hétérogénéité allélique ?

Quand une maladie génétique peut être due à des mutations différentes du même gène:

➤ NON

✓ Drépanocytose: la mutation Q26V dans le gène de la β globine

1 seule mutation à rechercher

Cette situation est rarissime

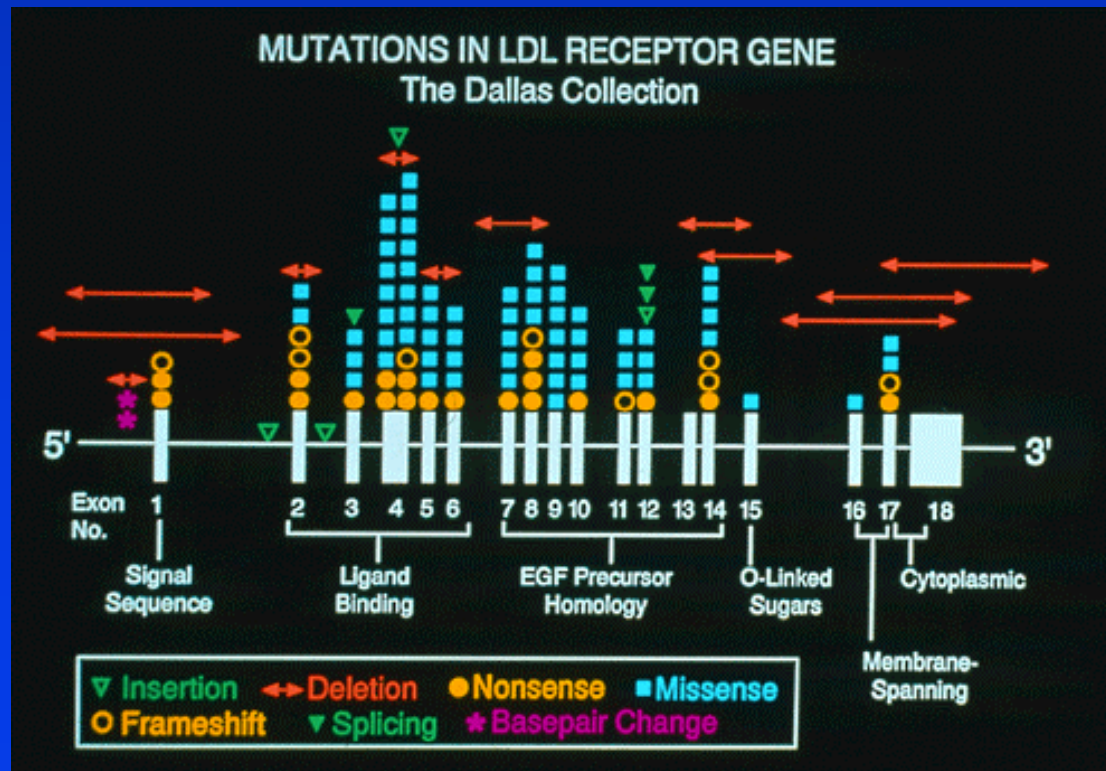
LES QUESTIONS (3b)

◆ Hétérogénéité allélique ?

➤ OUI

- ✓ Mucoviscidose (1000 mutations différentes);
- ✓ Myopathie de Duchenne;
- ✓ Phénylcétonurie;
- ✓

Tout ou partie du gène à explorer



Mutations dans le gène du récepteur aux LDL

LES QUESTIONS (4a)

◆ Type des mutations (1)?

➤ Ponctuelles dans la séquence codante:

- ✓ Drépanocytose
- ✓ Phénylcétonurie
- ✓ Mucoviscidose;

➤ Si il existe des **mutations récurrentes**: $\Delta F508$, 29 autres mutations - Kits commerciaux
si test négatif: séquençage systématique des exons.

➤ Si pas de mutations récurrentes: séquençage systématique des exons

LES QUESTIONS (4b)

◆ Type des mutations (2)?

➤ Réarrangements génomiques:

- ✓ Myopathie de Duchenne (délétions pouvant emporter x exons)
- ✓ Maladie de Charcot-Marie-Tooth (type 1A);
- ✓ Maladie de Parkinson due à des mutations de la Parkine
- ✓ **Microsatellites, MLPA, QMPSF, ...**

➤ Mutations par expansion:

- ✓ Maladie de Huntington (CAG codant);
- ✓ X fragile (CGG en 5')
- ✓ Ataxie de Freidreich (GAA intronique);
- ✓ Myotonie de Steinert **Southern blot, amplification par PCR,**

Il faut toujours connaître la **sensibilité et la **spécificité**
de la méthode de détection employée**

Variant protéique ou Mutation causale ?

Arguments en faveur de la responsabilité d'une mutation:

- Ségrégation du variant:
 - ✓ Ségrégation parfaite avec la maladie dans la famille
 - ✓ Variant apparu de novo concomitamment au phénotype

- Variant non retrouvé dans une population contrôle:
 - ➡ Le rechercher chez au moins 200 témoins

- Type de la mutation: mutation tronquante;
- Résidu touché très conservé dans l'évolution;
- Tests fonctionnels.

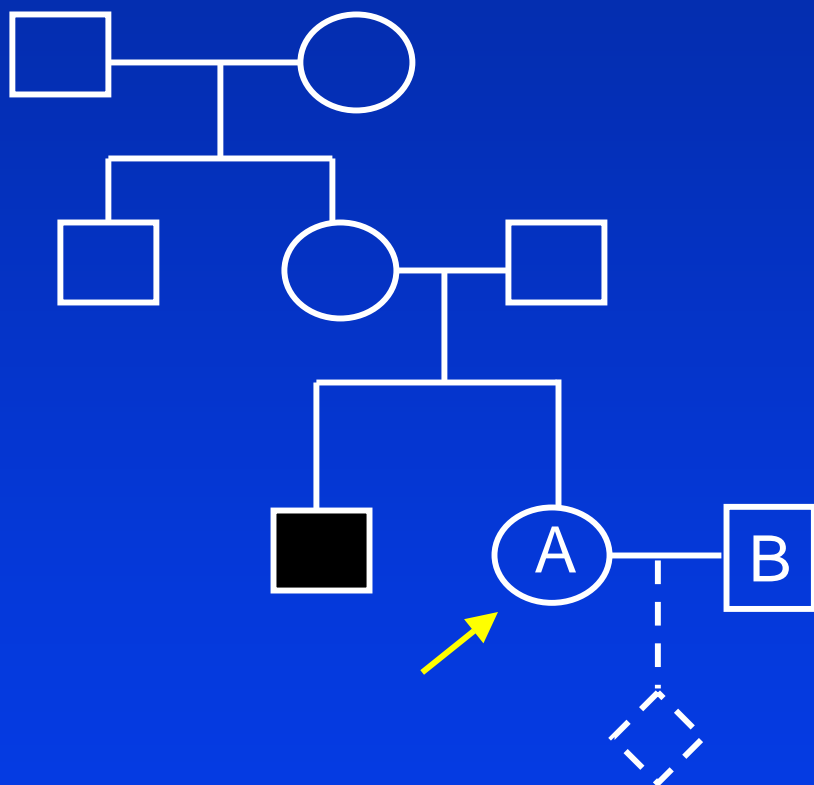
LE CONSEIL GENETIQUE

Conseil génétique

Mucoviscidose

Fréquence Malades: 1/2500

Fréquence Hétérozygotes: 1/25



A, 24 ans est saine donc risque H: 2/3

B, sain, risque H: 1/25

(si pas de consanguinité)

Risque transmission à leur enfant: 1/4

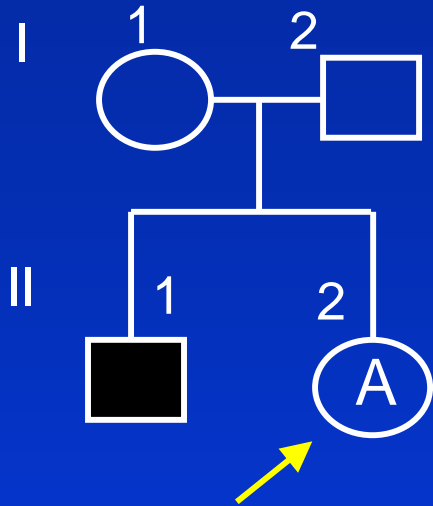
Donc $2/3 \times 1/25 \times 1/4 = 1/150$

Mucoviscidose:

- **AR:** on cherche 2 mutations;
- **Homogénéité génétique:** gène CF;
- **Hétérogénéité allélique:** oui
- **Type de mutation:** ponctuelle ou délétion de qq pb
1 mutation fréquente (70%) Δ F508 (délétion de 3bp)

La mutation Δ F508 est recherchée dans un premier temps car près de **50% des patients** en France sont homozygotes pour cette mutation

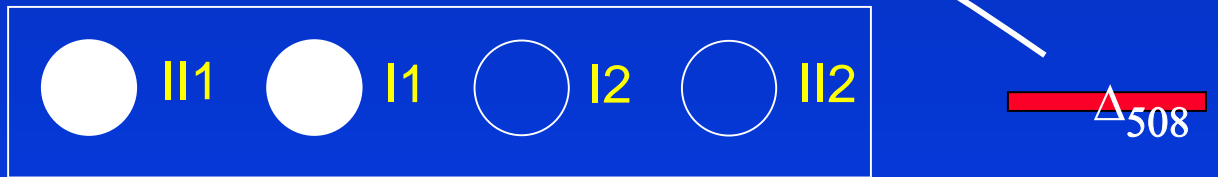
Recherche de DF508 par « Allele Specific nucleotide H» (ASO)



1- Amplification des 2 copies par PCR

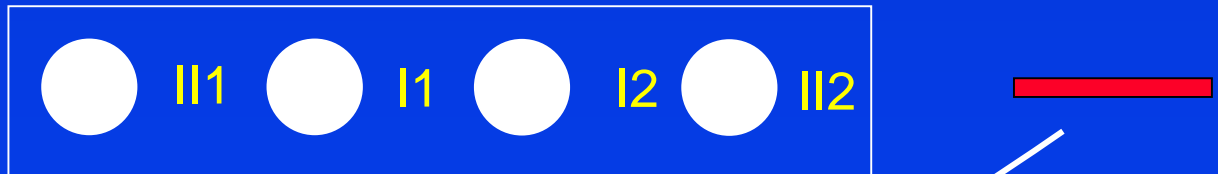
2- Dénaturation de l'ADN et dépôt sur une membrane:

3-hybridation avec une sonde mutée $\Delta 508$:



4- Dés hybridation:

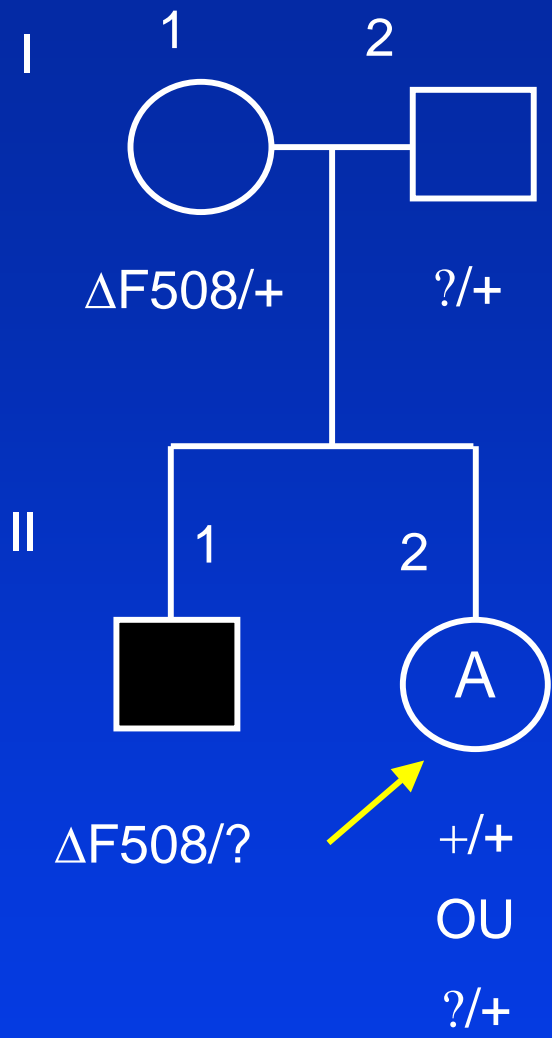
5-hybridation avec une sonde de séquence normale:



- La sonde radiomarquée s'est hybridée avec l'ADN cible: il y a complémentarité parfaite
- La sonde radiomarquée ne s'est pas hybridée avec l'ADN cible: il n'y a pas complémentarité parfaite

Génotype pour $\Delta 508$:

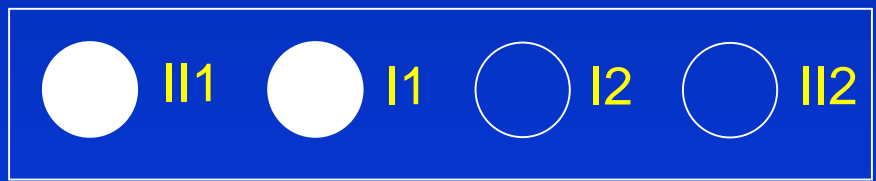
$\Delta F508/+$ $\Delta F508/+$ $+/+$ $+/+$



1- Amplification des 2 copies par PCR

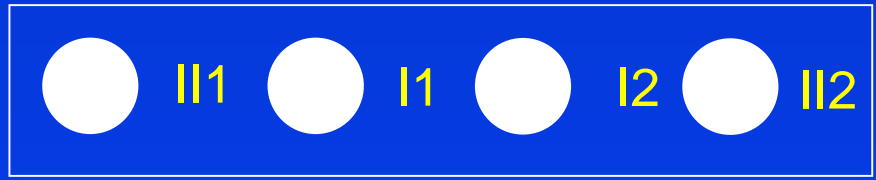
2- Dénaturation de l'ADN et dépôt sur une membrane:

3-hybridation avec une sonde mutée $\Delta 508$:



4- Déshybridation:

5-hybridation avec une sonde de séquence normale:



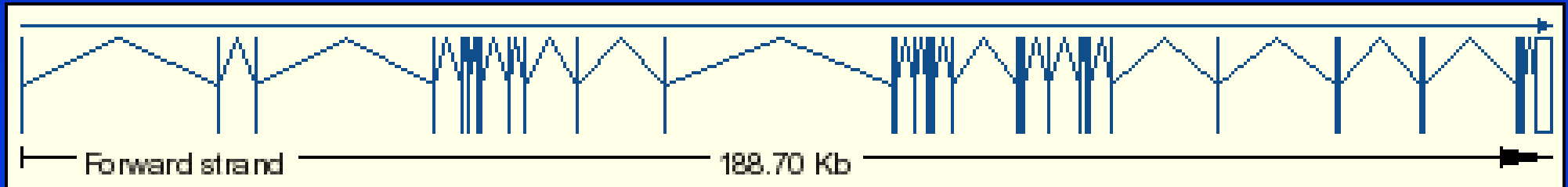
$\Delta F508/+$ $\Delta F508/+$ $+/+$ $+/+$

Il faut donc identifier la **seconde mutation**:

➤ L'utilisation des kits commerciaux a éliminé les 29 mutations les plus fréquentes (90% des mutations);

➤ Il faut alors explorer **toute la séquence codante** du gène: **27 exons**

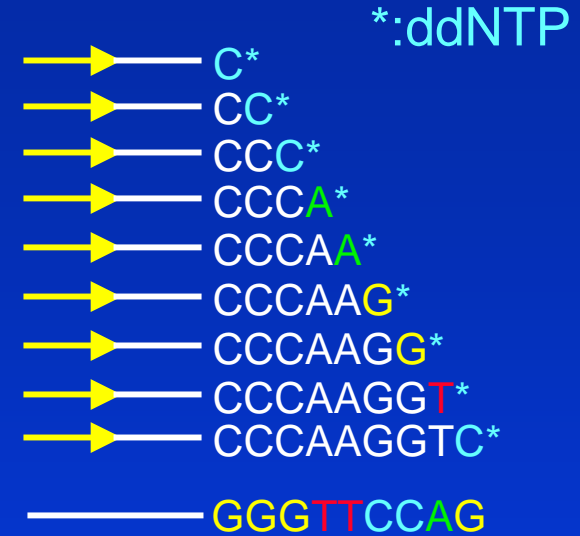
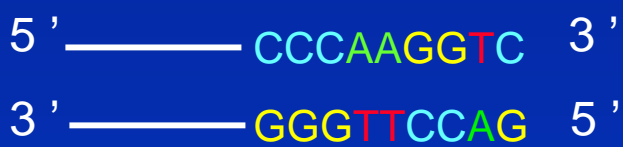
5'



3'

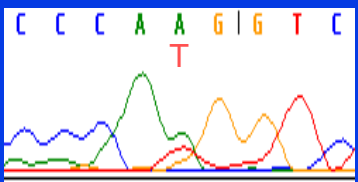
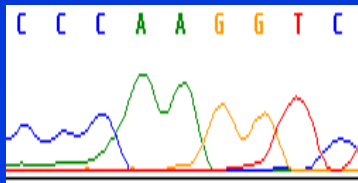
- Amplification spécifique de 27 fragments (exons) PCR;
- Séquençage de chaque fragment.

Séquençage direct sur produit de PCR



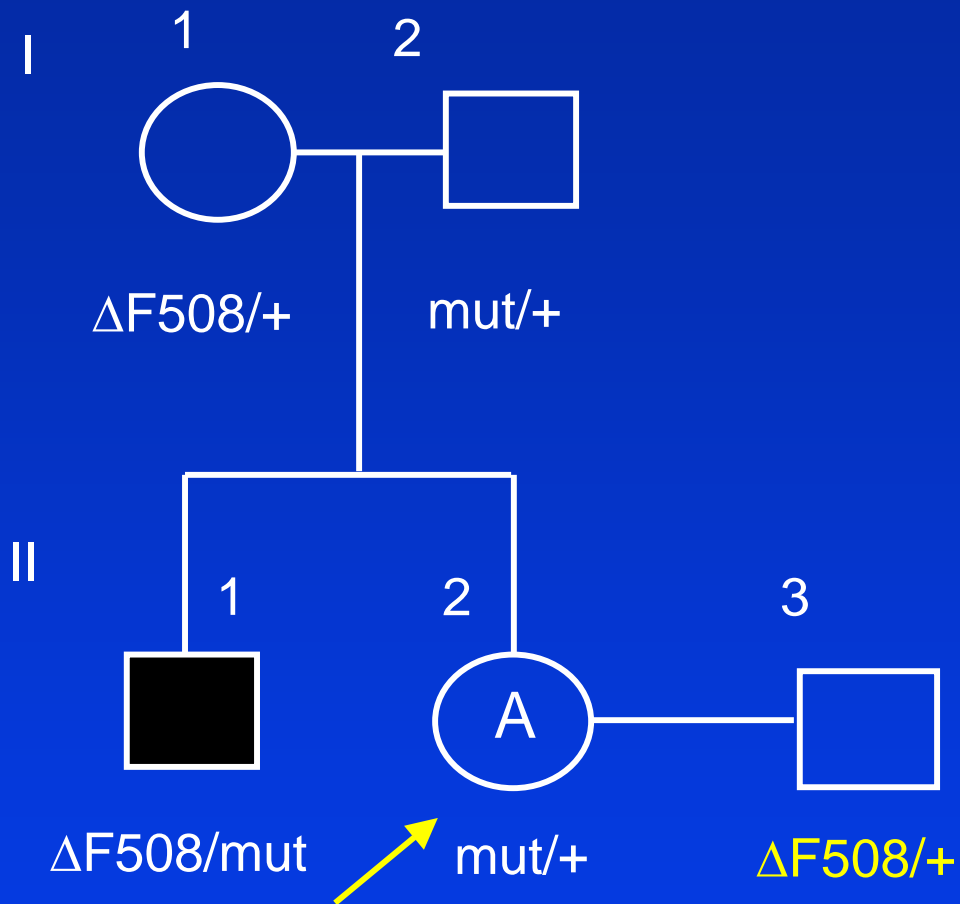
Produit amplifié par PCR

Mutation « mut » dans le 23^{ème} exon



Laser
Caméra CCD





➤ Le risque de A pour sa descendance a été Majoré par les résultats du test moléculaire: de 1/150 à **1/100**

➤ Un test moléculaire a été pratiqué chez son Conjoint II.3: **$\Delta F508/+$**

➤ Le risque d'avoir un enfant atteint pour le couple est $\frac{1}{4}$

La demande d'un diagnostic prénatal est justifiée

LE DIAGNOSTIC PRENATAL

LE CONTEXTE

- ◆ Il est indispensable de connaître:
 - La(es) **MUTATION(S)** responsable(s) dans la famille;
 - Le(s) porteur(s) dans le couple.

- ◆ Information lors d'1 (ou plusieurs) consultations de conseil génétique

- ◆ Approbation par une commission multidisciplinaire:
 - Maladie sévère en terme de pronostic vital et/ou fonctionnel;
 - Pour laquelle il n'existe pas de traitement.

EN PRATIQUE (1)

◆Prélèvement de villosités choriales:

- Entre 8-12 SA;
- Risque maternel faible (métorragies, hémorragies intrapéritonéales, infection, Iso-immunisation Rh);
- Risque foetal 2-5% (avortement);
- 10-20 mg de tissu.

◆Avant l'extraction d'ADN:

- Élimination de tout tissu maternel (dissection de la caduque);
- Recherche d'une anomalie de **nombre des chromosomes**.

◆Extraction d'ADN:

- Durée: ½ journée ± 1 nuit;
- Quantité: 500 ng-5 µg;
- Utilisable pour toute technique (pb de quantité pour le Southern blot).

EN PRATIQUE (2)

◆ Techniques PCR privilégiées:

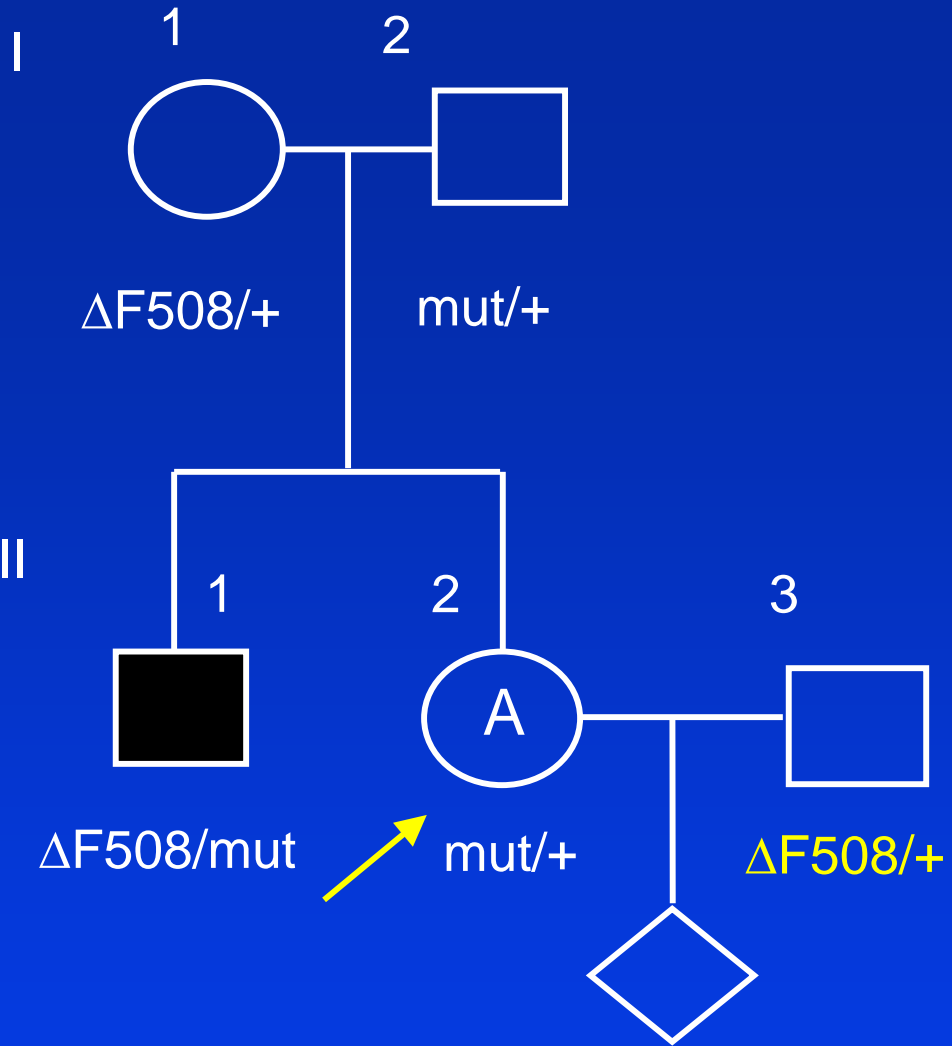
- Demande peu d'ADN (50 ng);
- Rapide < 7j;

◆ Recherche **ciblée** de la (des) mutation(s):

- Puisqu'elle est connue;
- Seulement **une partie** du gène est explorée (1 exon par exemple).

◆ Confirmation de l'absence de **contamination maternelle**:

- Par analyse de marqueurs microsatellites;
- Il faut au moins avoir l'ADN de la mère+++



1-Prélèvement des villosités choriales:

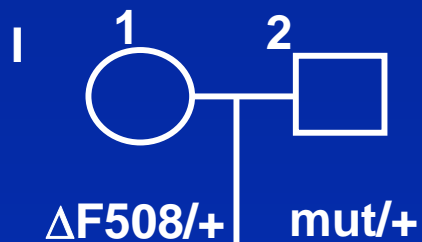
2-Extraction d'ADN

3-Analyses moléculaires de l'ADN:

- des villosités choriales;
- de la mère II.2
- du père II.3
- de témoins positifs pour chacune des mutations
- de témoins négatifs

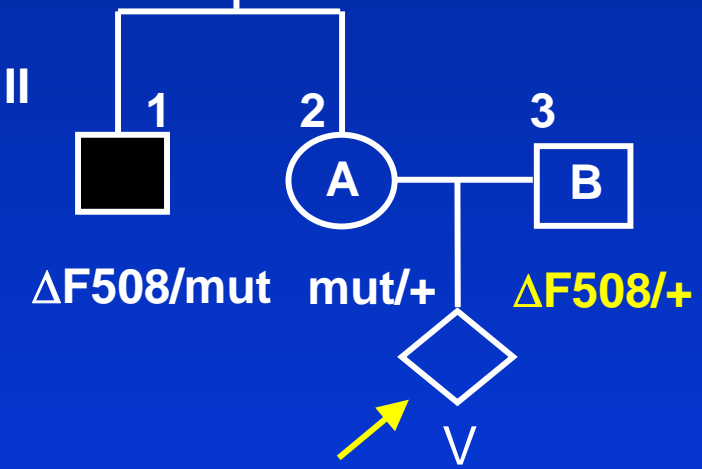
4- Recherche **ciblée** de:

- ΔF508 par technique ASO;
- Mut par séquençage de l'exon 23

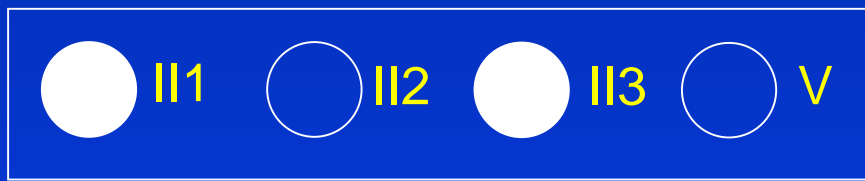


1- Amplification des 2 copies par PCR

2- Dépôt sur une membrane:

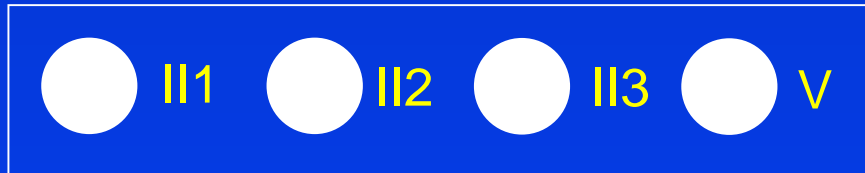


3-hybridation avec une sonde mutée $\Delta F508$:

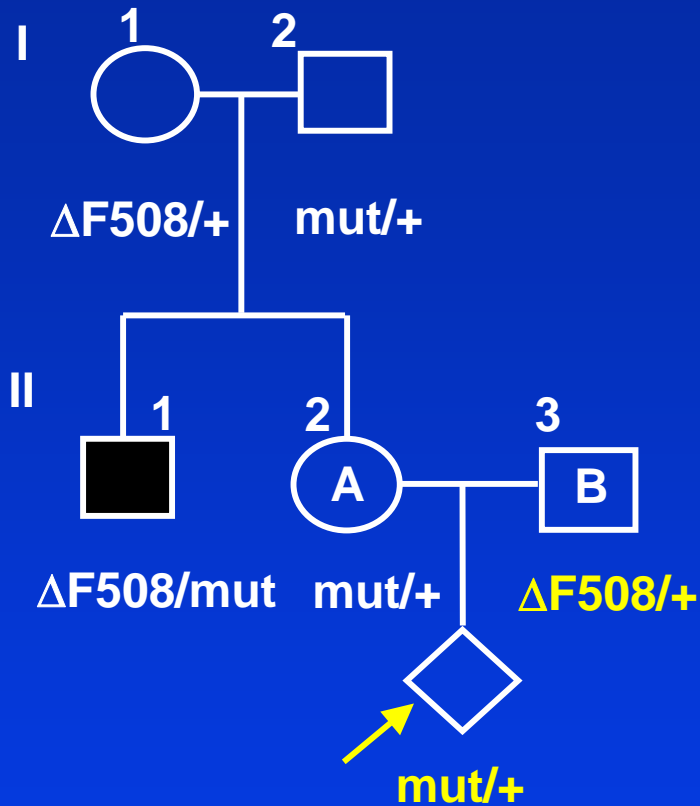


4- Désybridation:

5-hybridation avec une sonde de séquence normale:



Génotype pour $\Delta F508$: $\Delta F508 /+$ $+/+$ $\Delta F508 /+$ $+/+$



➤ L'ADN des villosités choriales **n'est pas porteur de la mutation $\Delta F508$** :

L'enfant ne sera donc **pas atteint** de mucoviscidose

➤ Le séquençage pour l'exon 23 de l'ADN des villosités choriales montre qu'il est **porteur de mut**:

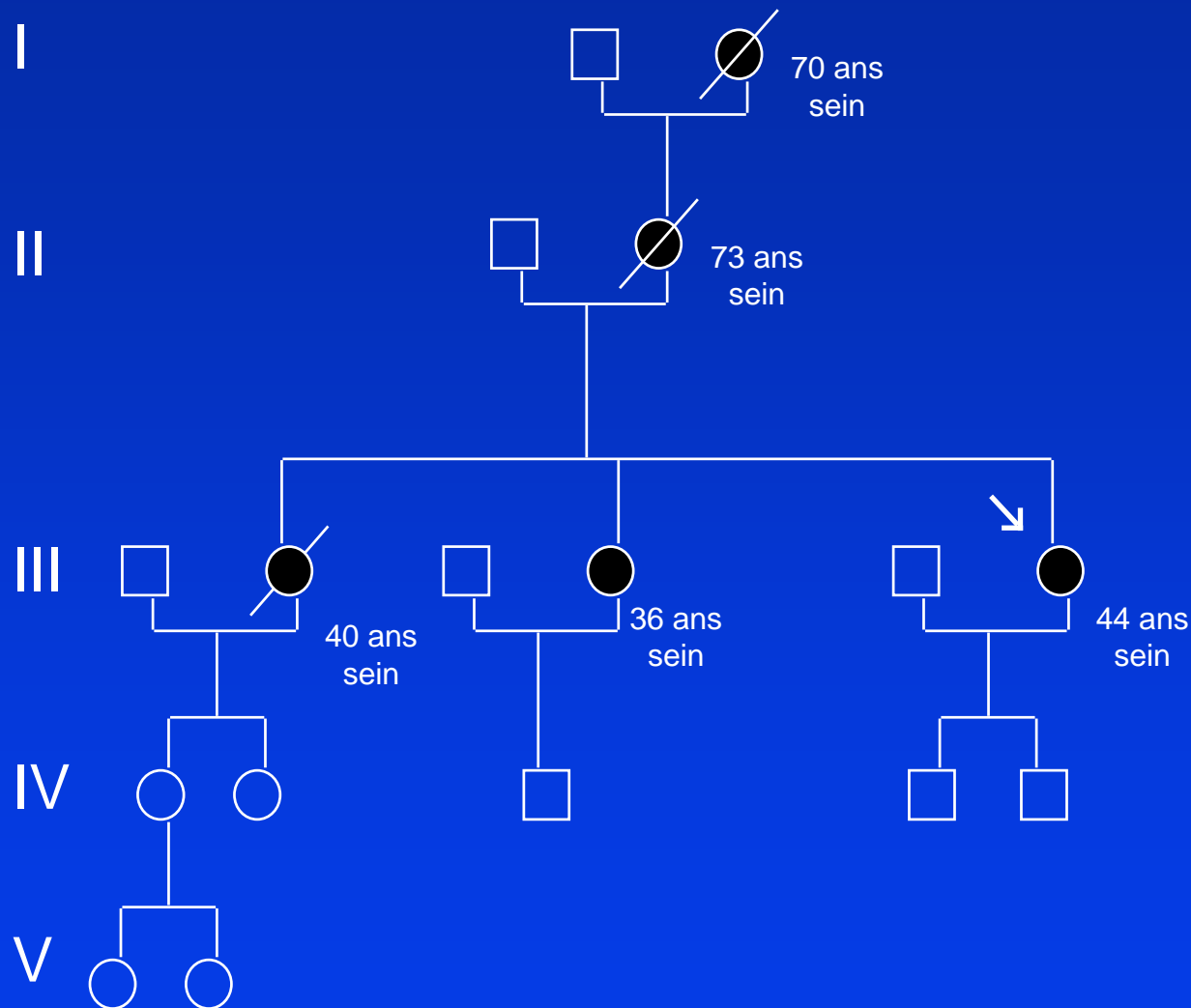
L'enfant sera donc **hétérozygote** pour la mucoviscidose

LE DIAGNOSTIC PRESYMPTOMATIQUE

LE CONTEXTE

- ◆ Il est indispensable de connaître:
 - La(es) **MUTATION(S)** responsable(s) dans la famille;
- ◆ Le diagnostic moléculaire se pratique dans le cadre d'un **protocole** de diagnostic présymptomatique
- ◆ Chez sujet asymptomatique **majeur** à risque pour la maladie.

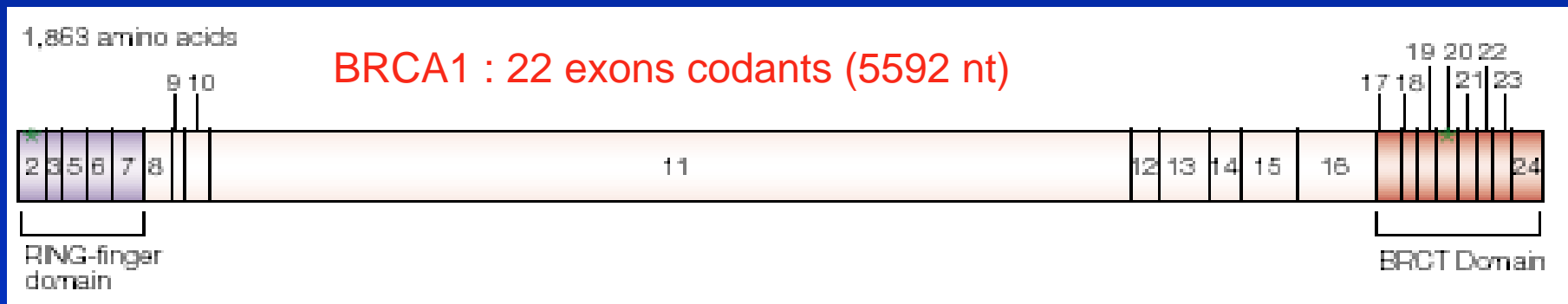
Exemple du cancer du sein familial



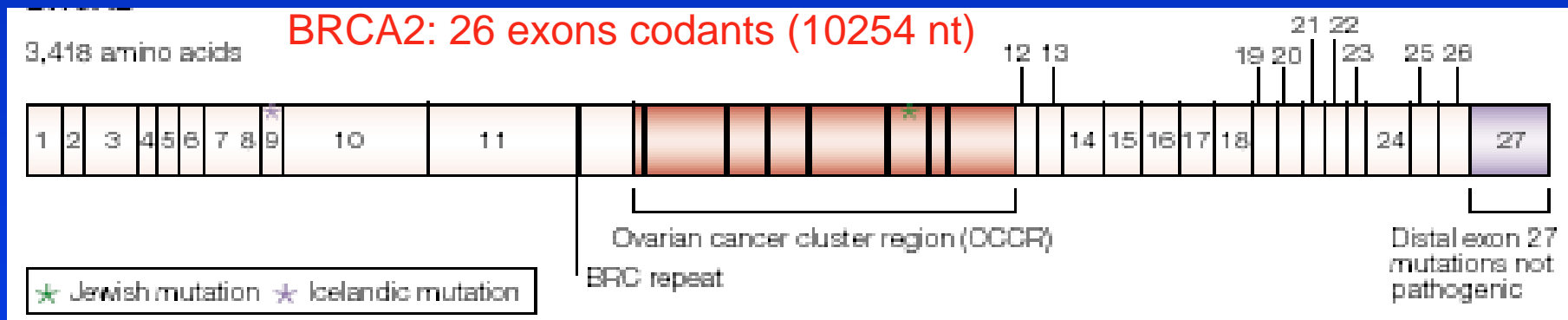
Cancer du sein familial:

- **AD:** une seule mutation à identifier
- **Hérérogénéité génétique:** BRCA1
BRCA2 (15 à 20% des familles+++)
- **Hétérogénéité allélique:** oui
- **Type de mutation:**
 - ✓ Ponctuelle
 - ✓ Réarrangements génomiques

HETEROGENEITE GENETIQUE ET ALLELIQUE

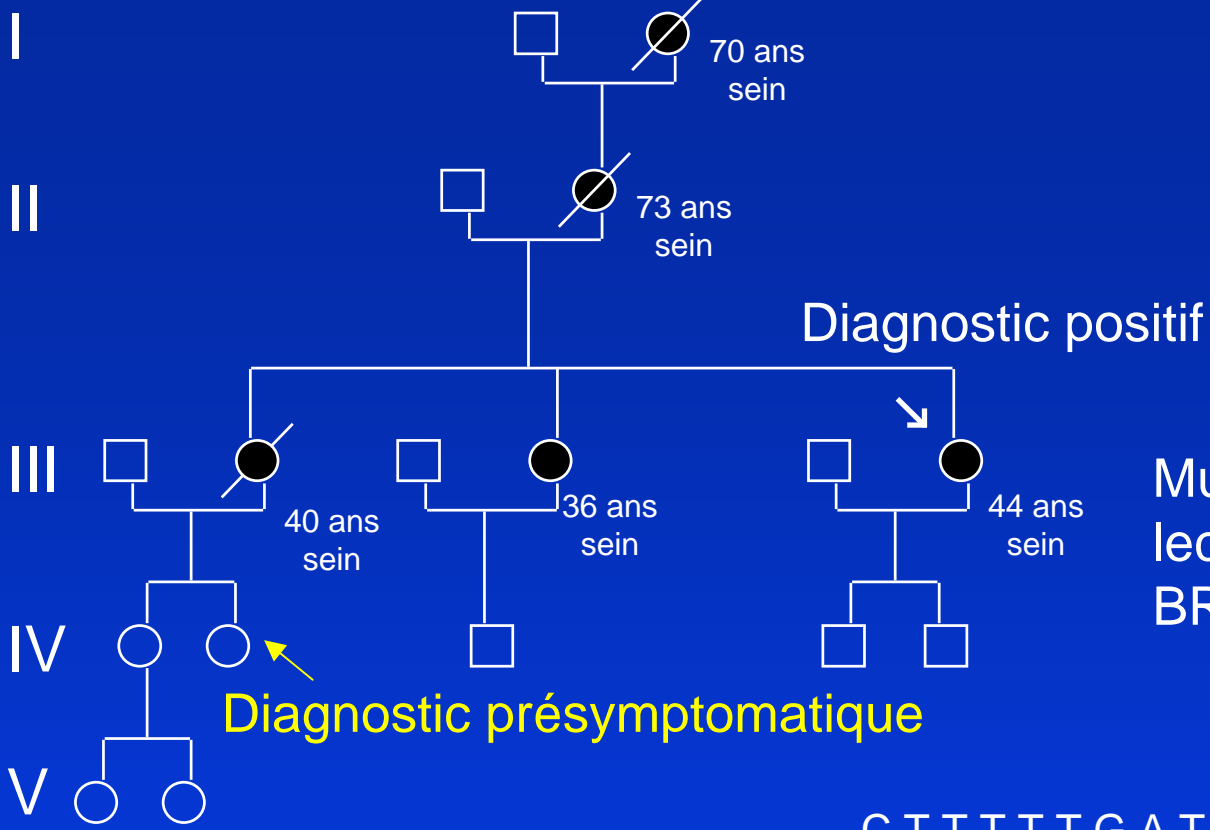


Base française de mutations : 828 mutations délétères (Lidereau 2004)

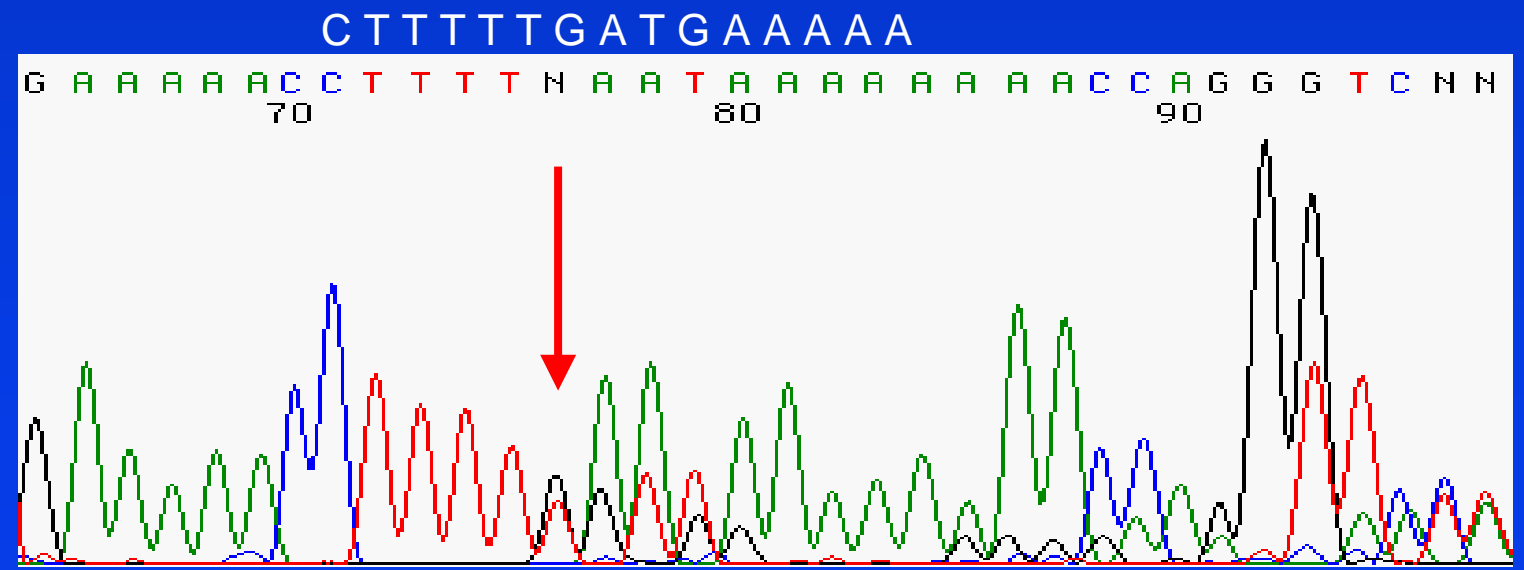


Base française de mutations : 432 mutations délétères (Lidereau 2004)

Mutations tronquantes +++



Mutation avec décalage du cadre de lecture sur l'exon 11 du gène:
BRCA2c.4866delT, p.Phe1546fsX1567



EN PRATIQUE

- ◆ Prélèvement effectué lors d'une consultation programmée dans le cadre d'un protocole de diagnostic présymptomatique;
- ◆ Le délai de rendu des résultats est **fixé** lors de la consultation de prélèvement:
 - 1 mois p.e. (la date de la consultation est fixée)
- ◆ Recherche **ciblée** de la mutation
 - Car elle est connue
 - Seulement **une partie** du gène est explorée (1 exon par exemple);
 - Analyse faite en duplicat (la stratégie dépend du laboratoire)

Risque de cancer du sein et de l'ovaire à 70 ans associé aux mutations BRCA

	BRCA1	BRCA2
sein	65% x10 [IC95%:51-75]	45% [IC95%:33-54]
ovaire	39% [IC95%:22-51]	11% [IC95%:4.1-18]

Antoniou A, Am J Hum Genet 2003

Risque de cancer du sein (population générale) : 7%

Prise en charge de femmes porteuses de mutations sur les gènes BRCA1 ou BRCA2

Eiseinger.F Ann Oncol 1998

Inserm-FNCLCC Expertise collective 1998 (mise à jour 2004)

Wooster R, New Engl J Med 2003, Nelson HD, Ann Int Med,2005

➤ Diagnostic précoce

- ✓ Examen direct (2-3/an), mammographie annuelle à partir de 30 ans
- ✓ Dépistage par IRM mammaire (1/an)

➤ Chirurgie prophylactique

- ✓ Ovariennne : recommandée à partir de 35 ans
- ✓ Mastectomie : à discuter

➤ Chimio-prévention :

- ✓ Tamoxifène, proposé à partir de 50 ans (sur 5 ans)