

DFGSM 2-3
Médecine



Génétique médicale

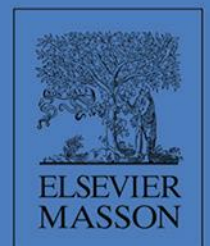
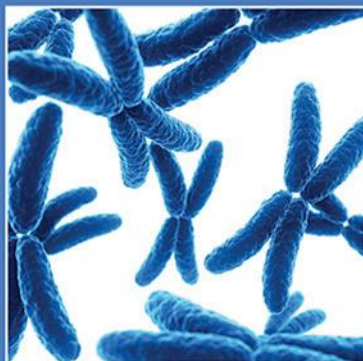
Enseignement thématique

Le cours
QCM corrigés



**Collège National
des Enseignants
et Praticiens
de Génétique Médicale**

Coordonné par
Martin Krahn
Damien Sanlaville



This page intentionally left blank

Génétique médicale

Enseignement thématique

Chez le même éditeur

Atlas d'anatomie humaine, par F. Netter, 2015, 6^e édition.

Gray's Anatomie pour les étudiants, par R.L. Drake et coll., 2015, 3^e édition.

Guide de thérapeutique 2015, par L. Perlemuter, G. Perlemuter, 2014, 8^e édition.

Dictionnaire médical, par J. Quevauvilliers, 2009, 6^e édition.

Lexique médical anglais-français/français-anglais, par D. Duizabo, 2009, 8^e édition.

Sémiologie clinique, par J. Bariéty, L. Capron, G. Gâteau, 2009, 8^e édition.

Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, par A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, 2013, 4^e édition.

Physiologie, par B. Lacour, J.-P. Belon, 2015.

Dans la même collection

Pathologie générale, par le Collège Français des Pathologistes (CoPath), 2013, 2^e édition.

Nutrition, par le Collège des Enseignants de Nutrition (CEN), 2014.

Les fondamentaux de la pathologie cardiovasculaire, par le Collège National des Enseignants de Cardiologie de la Société Française de Cardiologie (CNEC), 2014.

Les fondamentaux de la pathologie digestive, par la Collégiale des universitaires en hépato-gastro-entérologie (CDU-HGE), 2014.

Immunologie fondamentale et immunopathologie, par le Collège des Enseignants d'Immunologie (ASSIM), 2013.

Revêtement cutané, par le Collège National des Enseignants en dermatologie de France (CEDEF), 2015.

Rein et voies urinaires. Appareil génital masculin, par le Collège Français des Urologues (CFU), à paraître.

Embryologie et histologie humaines, par G. Tachdjian, S. Brisset, A.-M. Courtot, D. Schoëvaert, L. Tosca, à paraître.

Génétique médicale

Enseignement thématique

Sous l'égide du Collège national des enseignants
et praticiens de génétique médicale



Coordonné par :

Martin Krahn

MCU-PH en génétique médicale
INSERM UMRS910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université
Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone
Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille

Damien Sanlaville

PU-PH en génétique médicale
Hospices Civils de Lyon, GHE, HFME, service de génétique
CRNL, équipe TIGER, INSERM U1028, CNRS UMR5292, université Claude-Bernard, Lyon 1

Préface d'Arnold Munnich

Postface de Jean-François Mattei





Ce logo a pour objet d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, tout particulièrement dans le domaine universitaire, le développement massif du « photo-copillage ». Cette pratique qui s'est généralisée, notamment dans les établissements d'enseignement, provoque une baisse brutale des achats de livres, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.

Nous rappelons donc que la reproduction et la vente sans autorisation, ainsi que le recel, sont passibles de poursuites. Les demandes d'autorisation de photocopier doivent être adressées à l'éditeur ou au Centre français d'exploitation du droit de copie : 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris. Tél. 01 44 07 47 70.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés, réservés pour tous pays.

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

© 2016, Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

ISBN : 978-2-294-74521-8

e-ISBN : 978-2-294-74577-5

Elsevier Masson SAS, 62, rue Camille-Desmoulins, 92442 Issy-les-Moulineaux cedex
www.elsevier-masson.fr

Remerciements

Ce livre a été rédigé sous l'égide du **Collège national des enseignants et praticiens de génétique médicale** (CNEPGM), avec le soutien de la Fédération française de génétique humaine (FFGH) et coordonné par le Dr Martin Krahn (Marseille) et le Pr Damien Sanlaville (Lyon).

Le sommaire a été établi sur la base des thématiques de génétique médicale spécifiées pour l'enseignement du diplôme de formation générale en sciences médicales (*Bulletin officiel du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche* n° 17 du 28 avril 2011) :

- objectifs généraux :
 - connaître les bases essentielles de l'hérédité humaine, savoir appréhender l'influence du génome en pathologie humaine,
 - permettre à l'étudiant, quelle que soit sa future spécialité, d'acquérir les notions essentielles au diagnostic et à la prise en charge des patients atteints de maladies génétiques et de leur famille;
- principaux items :
 - bases moléculaires des modes de transmission héréditaire (hérédité : mode de transmission, hérédité multifactorielle (événements épigénétiques), notion de génétique formelle, notion de génétique des populations),

- maladies de transmission monogénique : dominantes, récessives, liées au sexe,
- anomalies chromosomiques et leurs mécanismes,
- maladies complexes : malformations, diabète, cancers, etc.,
- conseil génétique et calcul de risque en génétique,
- diagnostic prénatal et préimplantatoire,
- diagnostic présymptomatique et médecine prédictive,
- considérations éthiques, juridiques et psychologiques,
- perspectives thérapeutiques.

Le sommaire a été enrichi d'un complément abordant les principales thématiques de génétique médicale pour l'examen national classant (*Bulletin officiel du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche* n° 20 du 16 mai 2013).

Chaque chapitre a été rédigé par un ou plusieurs auteurs, spécialistes des thématiques respectives et invités par le CNEPGM, avec une relecture collégiale effectuée par des membres du CNEPGM.

Le CNEPGM remercie très sincèrement l'ensemble des collaborateurs ayant permis la finalisation de cet ouvrage national.

This page intentionally left blank

Liste des collaborateurs

Pr Benoît Arveiler, Laboratoire Maladies rares, génétique et métabolisme (EA 4576), université de Bordeaux

Service de génétique médicale, hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Dr Nathalie Auger, Laboratoire de cytogénétique, service de pathologie moléculaire, CLCC institut de cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif

Pr Laurent Becquemont, Faculté de médecine Paris Sud, hôpital Bicêtre, Paris

Réseau national de pharmacogénétique

Pr Christophe Bérout, INSERM UMR S910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone, AP-HM, Marseille

Dr Valérie Biancalana, Laboratoire de diagnostic génétique, CHU et faculté de médecine de Strasbourg

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), UMR 7104-U964 CNRS, INSERM et université de Strasbourg

Dr Chrystèle Bilhou-Nabéra, Laboratoire d'hématologie et d'immunologie biologiques (Pr Luc Douay), hôpital Saint-Antoine, Paris

Pr Dominique Bonneau, Département de biochimie et génétique, CHU d'Angers

Pr Martine Doco-Fenzy, Service de génétique, SFR CAP-santé, EA 3801, CHU de Reims

Pr Patrick Edery, Service de génétique, groupement hospitalier Est, hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron, Hospices Civils de Lyon

INSERM U1028, UMR CNRS 5292, CRNL, université Claude-Bernard-Lyon 1

Pr Josué Feingold, Institut Imagine, université Paris-Descartes, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Pr Claude Férec, Laboratoire de génétique moléculaire CHU de Brest

INSERM UMR 1078 Génétique, génomique, biotechnologies

Pr Thierry Frebourg, Département de génétique, CHU de Rouen

INSERM U1079, faculté de médecine et de pharmacie, université de Rouen

Dr Bénédicte de Fréminville, Service de génétique clinique, chromosomique et moléculaire, CHU de Saint-Étienne

Pr David Geneviève, Centre de référence Anomalies du développement et syndromes malformatifs

Département de génétique, CHRU de Montpellier

Pr Cyril Goizet, Laboratoire Maladies rares – Génétique et Métabolisme (EA4576), université de Bordeaux

Service de génétique médicale, hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux

Dr Delphine Héron, Unité fonctionnelle de génétique médicale AP-HP, département de génétique

Centre de référence Déficiences intellectuelles de causes rares

GRC-UPMC Génétique des déficiences intellectuelles

Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière et hôpital Trousseau, Paris

Dr Martin Krahn, INSERM UMR S910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone, AP-HM, Marseille

Pr Didier Lacombe, Service de génétique, CHU de Bordeaux, Laboratoire MRGM, université de Bordeaux

Centre de référence Anomalies du développement et syndromes malformatifs Sud-Ouest, Bordeaux

Pr Cédric Le Caignec, Service de génétique médicale, CHU de Nantes

Pr Bruno Leheup, CHU de Nancy, université de Lorraine

Dr Gaëtan Lesca, Faculté de médecine Lyon-Est, université Claude-Bernard-Lyon 1

Service de génétique médicale, Hospices Civils de Lyon

Pr Nicolas Lévy, INSERM UMR S910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone, AP-HM, Marseille

Pr Marie-Anne Lorient, Faculté de médecine Paris-Descartes, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris

Réseau national de pharmacogénétique

Pr Stanislas Lyonnet, Institut Imagine, université Paris-Descartes, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Dr Valérie Malan, Service d'histologie, embryologie et cytogénétique, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Dr Perrine Malzac, Département de génétique médicale et Espace éthique méditerranéen/ERERI-PACA Corse, AP-HM, Marseille

UMR 7268 ADES, Aix-Marseille Université-EFS-CNRS

Pr Jean-Louis Mandel, Laboratoire de diagnostic génétique, CHU et faculté de médecine de Strasbourg

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), UMR 7104-U964 CNRS, INSERM et université de Strasbourg

Collège de France, chaire de génétique humaine

Pr Jean-François Mattei, Professeur émérite de pédiatrie et génétique médicale

Membre de l'Institut de France et de l'Académie nationale de médecine

Ancien ministre de la Santé, de la Famille et des Personnes handicapées

Pr Arnold Munnich, Institut Imagine et université Paris-Descartes, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Membre de l'Académie des sciences

Pr Véronique Paquis-Flucklinger, Service de génétique médicale, CHU de Nice, hôpital l'Archet 2, Nice

IRCAN UMR CNRS 7284, INSERM U1081, UNS, faculté de médecine, Nice

Dr Béatrice Parfait, Service de biochimie et génétique moléculaire, hôpital Cochin, AP-HP, Paris

EA7331, université Paris-Descartes, Sorbonne-Paris-Cité, faculté de pharmacie de Paris

Dr Éric Pasmant, Service de biochimie et génétique moléculaire, hôpital Cochin, AP-HP, Paris

EA7331, université Paris-Descartes, Sorbonne-Paris-Cité, faculté de pharmacie de Paris

Pr Nicole Philip, Centre de référence Anomalies du développement et syndromes malformatifs PACA

Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone, AP-HM, Marseille

Faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Pr Serge Romana, Service d'histologie-embryologie-cytogénétique, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Dr Agnès Rötig, INSERM U1163, université Paris-Descartes, Sorbonne-Paris-Cité

Institut Imagine, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Pr Michel Roussey, CHU de Rennes, université de Rennes

Président de l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE)

Dr David Salgado, INSERM UMR S910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone, AP-HM, Marseille

Pr Damien Sanlaville, Hospices Civils de Lyon, GHE, HFME, service de génétique

CRNL, équipe TIGER, INSERM U1028, CNRS UMR5292, université Claude-Bernard, Lyon 1

Pr Jean Pierre Siffroi, Service de génétique et d'embryologie médicales, hôpital d'enfants Armand-Trousseau, CHU Paris-Est

Dr Renaud Touraine, Service de génétique clinique, chromosomique et moléculaire, CHU de Saint-Étienne

Dr Dominique Vidaud, Service de biochimie et génétique moléculaire, hôpital Cochin, AP-HP, Paris

EA7331, université Paris-Descartes, Sorbonne-Paris-Cité, faculté de pharmacie de Paris

Pr Michel Vidaud, Service de biochimie et génétique moléculaire, hôpital Cochin, AP-HP, Paris

EA7331, université Paris-Descartes, Sorbonne-Paris-Cité, faculté de pharmacie de Paris

Relecteurs

Pr Benoit Arveiler, Laboratoire Maladies rares, génétique et métabolisme (EA 4576), université de Bordeaux

Service de génétique médicale, hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Pr Brigitte Gilbert Dussardier, Service de génétique médicale, EA 3808, Université de Poitiers

Dr Isabelle Coupier, Service de génétique, unité d'oncogénétique, CHRU de Montpellier

Pr David Geneviève, Centre de référence Anomalies du développement et syndromes malformatifs

Département de génétique, CHRU de Montpellier

Dr Delphine Héron, Unité fonctionnelle de génétique médicale AP-HP, département de génétique

Centre de référence Déficiences intellectuelles de causes rares GRC-UPMC Génétique des déficiences intellectuelles

Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière et hôpital Trousseau, Paris

Dr Martin Krahn, INSERM UMR S910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Département de génétique médicale, hôpital d'enfants La Timone, AP-HM, Marseille

Pr Anne-Sophie Lebre, Service de génétique et biologie de la reproduction, CHU de Reims

UMR CNRS/URCA n° 7369, faculté de médecine, université de Reims

Pr Bruno Leheup, CHU de Nancy, université de Lorraine

Dr Gaëtan Lesca, Faculté de médecine Lyon-Est, université Claude-Bernard-Lyon 1

Service de génétique médicale, Hospices Civils de Lyon

Pr Stanislas Lyonnet, Institut Imagine, université Paris-Descartes, hôpital Necker-Enfants malades, Paris

Pr Sylvie Manouvrier, Clinique de génétique médicale Guy-Fontaine, CHRU de Lille

Département universitaire de génétique, faculté de médecine, université de Lille 2

Dr Sandrine Marlin, Département de génétique, hôpital Necker-Enfants malades, CHU de Paris

INSERM UMRS 587, Institut Pasteur

Dr Sandra Mercier, Service de génétique médicale, CHU de Nantes

Dr Karine Nguyen, INSERM UMRS910, faculté de médecine, Aix-Marseille Université

Département de génétique médicale, AP-HM, Marseille

Pr Damien Sanlaville, Hospices Civils de Lyon, GHE, HFME, service de génétique

CRNL, équipe TIGER, INSERM U1028, CNRS UMR5292, université Claude-Bernard, Lyon 1

Dr Caroline Schluth-Bolard, Hospices Civils de Lyon, GHE, HFME, service de génétique CRNL, équipe TIGER, INSERM U1028, CNRS UMR5292, université Claude-Bernard, Lyon 1

Pr Alain Verloes, Département de génétique, hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris

This page intentionally left blank

Préface

La génétique médicale entre rêve et réalité

Au siècle dernier, la génétique nous a enchantés et terrifiés à la fois. Monstrueusement utilisée dans les années 1940, elle a été ensuite investie d'immenses espérances. Elle a été considérée comme capable de tout prédire, de tout prévenir, de tout guérir.

Mais qu'en est-il au juste ? La génétique a-t-elle révolutionné les soins comme on nous l'avait promis ? La réponse est tout en nuances, en demi-teinte.

L'essor de la génétique a assurément simplifié, accéléré et étendu nos capacités à porter des diagnostics, dans les maladies génétiques comme dans les cancers. J'ai connu l'époque où il fallait beaucoup de temps, de souffrances et de journées d'hospitalisation pour porter un diagnostic de myopathie ou de mucoviscidose.

Aujourd'hui, un examen génétique se fait sur une simple prise de sang. Le test lui-même est beaucoup plus rapide que la consultation médicale qui précède. Plus rapide que les longues explications dues aux patients et aux familles. Car il s'agit de bien se faire comprendre avant d'obtenir un consentement éclairé.

Notre refus de banaliser ces tests et le respect scrupuleux des bonnes pratiques protègent nos concitoyens contre les risques de dérives eugéniques de toutes natures. Ils sont à l'honneur de la médecine française comme du législateur.

Aujourd'hui, presque tous nos gènes sont connus. Et bientôt seront connus les gènes de toutes les maladies. La prouesse qu'a constitué, il y a près de dix ans, le séquençage de notre génome s'est simplifié au point de devenir bientôt un outil diagnostique de routine, à la portée de presque toutes les bourses. Il n'est pas impossible que le séquençage du génome d'un patient devienne bientôt nettement moins onéreux qu'un scanner, une IRM ou une endoscopie.

Mais si le diagnostic est une chose, le pronostic en est une autre. Le gène responsable de la maladie fait le diagnostic, mais ce sont les milliers d'autres gènes du sujet et son environnement qui conditionnent l'expression de ce gène malade et donc le pronostic. C'est bien ce qui rend chimérique le rêve prométhéen de tout prédire. C'est ce qui interdit la généralisation du séquençage aux allures de « boule de cristal ». En effet, comment prendre le risque d'une prédiction, si on n'est pas en mesure d'interpréter ce qu'on lit (je devrais dire ce qu'on annonce...) ni d'affirmer quand, comment et avec quelle intensité une éventuelle maladie peut se déclarer dans le futur ? Là est la limite de ce qu'il était convenu d'appeler la médecine prédictive. L'ignorer, c'est s'exposer à d'innombrables erreurs par excès ou par défaut, à d'interminables poursuites judiciaires et à des procès sans fins. « Ne vas pas colportant le mal parmi les tiens », nous dit l'Écriture.

L'essor de la génétique a aussi, et c'est heureux, gommé la notion de « race » ou de « tare génétique » en nous apprenant que nous sommes tous porteurs d'une bonne trentaine de mutations, héritées ou accidentelles, plus ou moins expressives. Et habituellement totalement muettes. Mais pour le traitement des patients, quels sont les bénéfices réels de l'essor de la génétique ? Si vous posez la question à la sortie d'une classe de terminale, ou d'un amphithéâtre de faculté, la réponse qui vous sera faite sera invariablement « la thérapie génique et le clonage »... Fascinés, non sans raison, par ces perspectives, nos contemporains tendent à ignorer tout à la fois l'essor des thérapeutiques conventionnelles aujourd'hui disponibles et l'impact de la prise en charge symptomatique sur la qualité et l'espérance de vie des personnes atteintes de maladies génétiques.

Ce n'est pas de l'ingratitude. C'est un problème d'information dans un contexte médiatique simplificateur où les rêves l'emportent sur la réalité et le sensationnel sur le concret. Alors, tentons de rendre à César ce qui lui appartient et de faire loyalement l'inventaire de ce qui est d'ores et déjà du domaine du possible. À la lumière de quelques exemples, demandons-nous si le remplacement d'un gène, dont l'identification est si nécessaire à la compréhension d'une maladie, est véritablement la panacée pour le traitement des maladies génétiques...

Rendre à César ce qui lui appartient, c'est déjà se souvenir qu'on n'a pas attendu l'ère de la génétique moléculaire pour traiter des maladies génétiques.

On n'a pas attendu le clonage du gène de la phénylalanine hydroxylase pour traiter la phénylcétonurie par un régime. Ainsi, depuis les années 1970, près de 25 millions de Français ont été testés à la naissance, sans même le savoir, et 10-15 000 d'entre eux, dépistés et traités tôt, ont échappé à une arriération mentale certaine. Ce sont aujourd'hui des adultes bien-portants et des parents à leur tour.

Et il ne se passe pas d'année sans que l'élucidation du mécanisme d'une maladie ne suggère une riposte thérapeutique. À preuve, les spectaculaires formes de maladies de la glycosylation curables par le mannose et les déficiences intellectuelles et syndromes autistiques curables par l'administration orale de créatine. On voit bien que le véritable défi d'aujourd'hui n'est pas de traiter tant de maladies si différentes mais plutôt d'identifier, parmi tous ces enfants, celles et ceux qu'on peut soigner... Pour ceux-là, la vie va changer...

Rendre à César ce qui lui appartient, c'est aussi se souvenir que ce n'est pas notre génération, mais bien celle de nos Maîtres qui, la première, a traité les néphropathies héréditaires par la transplantation rénale (syndrome d'Alport, néphronophtise et polykystose), les atrésies biliaires par transplantation hépatique, les cardiopathies congénitales par la transplantation cardiaque et les déficits immunitaires par les greffes de moelle.

Souvenons-nous des orthopédistes et des réanimateurs qui, les premiers, ont eu l'audace d'opérer le rachis des enfants myopathes. Souvenons-nous des pionniers de la chirurgie viscérale qui ont guéri la maladie de Hirschsprung, les hernies diaphragmatiques, les malformations gastro-œsophagiennes. Souvenons-nous des noms de ces pionniers en France : Hamburger, Royer, Broyer, Alagille, Carpentier, Cabrol, Dubousset, Barois, Griscelli...

Mais notre génération n'est pas en reste : comment ne pas admirer les résultats fascinants de l'électrostimulation dans les dystonies de torsion, les chorées de Huntington et tant d'autres dystonies. Ces neurochirurgiens, fort peu familiers

de la génétique moléculaire, ont, sans aucun doute, fait bien davantage pour ces enfants que toute la communauté des généticiens réunie.

Rendre à César ce qui lui appartient, c'est enfin se souvenir que l'industrie pharmaceutique a su transformer nos connaissances en des protéines et des enzymes, médicaments sûrs et efficaces : l'insuline, l'hormone de croissance pour le traitement des nanismes héréditaires, le facteur VIII pour celui de l'hémophilie et l'enzymothérapie des maladies lysosomales (maladies de Gaucher, Hurler, Fabry, Pompe).

Loin de moi de penser que les thérapies géniques et cellulaires n'auront pas un jour leur place dans l'arsenal des thérapeutiques. Mais, pour le patient comme pour le médecin confrontés à la réalité de la maladie génétique aujourd'hui, il faut trouver des astuces pour tenir, pour durer : il faut ruser.

Ruser, c'est par exemple obtenir la réexpression d'un gène d'hémoglobine fœtale par l'hydroxyurée lorsque le gène adulte est muté : voilà que les enfants thalassémiques et drépanocytaires se passent de transfusion...

Ruser, c'est épurer un toxique au moyen d'une drogue comme la cystéamine dans la cystinose. Ruser, c'est savoir verrouiller le catabolisme de la tyrosine par le NTBC et transformer l'effroyable tyrosinémie de type 1 en une tyrosinémie de type 2 pratiquement bénigne : 90 % des enfants sont guéris.

Ruser, c'est découvrir, un peu par hasard, que la colchicine transforme, on ne sait ni pourquoi ni comment, l'expression de la fièvre méditerranéenne familiale.

Ruser, c'est savoir inhiber une fonction normale si cette dernière majore les conséquences d'une mutation. Ainsi, les bisphosphonates, en inhibant l'activité ostéoclastique, limitent la résorption osseuse et réduisent les conséquences des mutations du collagène du type 1 dans l'ostéogenèse imparfaite. La mutation est toujours là, mais les fractures multiples et les douleurs osseuses sont considérablement réduites.

Ruser, enfin, c'est savoir protéger une fonction menacée au moyen d'un médicament, comme les quinones à courte chaîne ou des chélateurs du fer qui protègent la chaîne respiratoire contre le stress oxydatif dans la maladie de Friedreich : la myocardiopathie est jugulée chez 85 % des enfants.

On le voit bien, les faits sont têtus ! Nos malades ne souffrent pas de leurs mutations mais des conséquences fonctionnelles de ces mutations.

Alors, ne nous trompons pas d'ennemi. La compréhension du mécanisme d'une maladie génétique se révèle souvent plus utile pour circonvier le problème que le remplacement du gène muté, techniquement si complexe.

La compréhension du mécanisme exact des maladies : voilà l'information dont nous avons réellement besoin pour imaginer des trucs, des astuces qui changeront la vie des gens. Et pas seulement celle des personnes atteintes de maladies rares. Il y a gros à parier que l'étude attentive de ces cas extrêmes que sont les maladies rares finira par éclairer notre compréhension des maladies communes et leur traitement. Gardons-nous donc du dogmatisme et de la pensée unique. Le traitement des maladies génétiques est une affaire trop sérieuse pour qu'il en soit fait une question de mode.

Alors, de grâce, ne mettons pas tous nos œufs dans le même panier... Sachons innover mais assurons-nous que nos innovations restent économiquement et éthiquement acceptables. Et, surtout, sachons préserver nos valeurs de frugalité et de solidarité qui sont le socle de notre système de protection sociale français.

Pr Arnold Munnich

Institut Imagine et université Paris-Descartes,
hôpital Necker-Enfants malades, Paris
Membre de l'Académie des sciences

This page intentionally left blank

Avant-propos

Les maladies rares

Une maladie est dite rare lorsqu'elle atteint moins d'une personne sur 2 000. Plus de 8 000 maladies rares sont aujourd'hui décrites, de fait on estime que 3 millions de personnes sont concernées en France. Ce nombre se situe entre 27 et 36 millions de personnes en Europe, touchant entre 6 et 8 % de la population au cours de sa vie.

Bien que la notion de maladies rares soit indissociable de la génétique médicale, dans la mesure où plus de 80 % d'entre elles ont une origine génétique déterminante, il faut souligner d'une part l'importance des maladies rares non génétiques ou du moins non monogéniques, et, d'autre part, que toutes les maladies génétiques ne sont pas des maladies rares (par exemple la polykystose rénale autosomique dominante, dont la prévalence est de 1/1 000)¹.

Nombreux et difficiles sont les défis qui restent à relever dans le domaine des maladies rares pour lesquelles, pour la majorité d'entre elles, aucun traitement spécifique n'est disponible.

Un défi pour le diagnostic

Les maladies rares sont généralement sévères, chroniques, invalidantes et engagent souvent le pronostic vital. Dans plus de la moitié des cas, elles se développent dès l'enfance et on estime qu'elles sont responsables de plus de 30 % de la mortalité infantile. Pourtant, bien que majoritairement « monogéniques », les mutations et les gènes responsables ont été identifiés dans environ la moitié des maladies rares, laissant un nombre au moins équivalent sans identification des bases génétiques.

¹ Indépendamment du seuil théorique de prévalence fixé comme étant en dessous de 1/2 000, certaines pathologies non rares a priori, telle la polykystose rénale autosomique dominante et d'autres maladies génétiques, partagent cependant les mêmes problématiques que les maladies rares en termes de mécanisme, difficulté de prise en charge et/ou recherche thérapeutique. Il est d'ailleurs notable que le premier médicament indiqué dans la PKD1 ait reçu un statut de médicament orphelin.

Un défi pour la prise en charge thérapeutique

Aujourd'hui, seuls 250 à 300 médicaments spécifiques sont indiqués pour des maladies rares. Mis en perspective des milliers de maladies et des millions de malades atteints, on mesure le chemin restant à parcourir. Les patients doivent le plus souvent faire face à la maladie avec, au mieux, des traitements symptomatiques. Concernant les maladies rares génétiques pour lesquelles les gènes responsables ont été mis en évidence, la fonction de ceux-ci ainsi que les mécanismes physiopathologiques associés ne sont à ce jour que très incomplètement élucidés, limitant ainsi les développements thérapeutiques ciblés.

Un enjeu de santé publique

Depuis le milieu des années 1980, la France a développé une véritable dynamique médicale, scientifique et sociale autour des maladies rares, en devenant un pays pionnier du domaine à l'échelle européenne. La France a en particulier été le premier pays en Europe à se doter d'un Plan National de Santé Publique Maladies Rares (2004–2008) qui a permis des avancées significatives notamment pour l'accès au diagnostic et à la prise en charge des personnes malades, notamment avec la mise en place de centres de référence et de centres de compétences. Le deuxième Plan National Maladies Rares, initié en 2011 dans la continuité du premier plan, a eu pour objectifs de soutenir trois axes stratégiques : améliorer la qualité de la prise en charge des malades, développer la recherche et amplifier les coopérations européennes et internationales. La création de la Fondation maladies rares est intervenue dans ce deuxième plan comme mesure phare de l'axe recherche.

Dans ce paysage, évoqué ici de façon succincte et certainement incomplète, des éléments essentiels doivent cependant être soulignés. Certes le chemin restant à parcourir sera encore long et difficile, mais chaque jour qui passe apporte son cortège de découvertes et d'avancées significatives pour les malades. Ce constat s'applique à la connaissance des causes et des mécanismes, comme à l'identification de preuves de concept thérapeutiques précliniques voire dans le cadre de phases précoces d'essais cliniques. Bien que peu de malades ne puissent encore bénéficier de traitements spécifiques, nombreux sont les essais permettant de tester l'efficacité de nouveaux traitements et il ne fait aucun doute que les résultats les plus prometteurs seront transposés sans tarder en clinique.

Par ailleurs, la révolution technologique à laquelle nous assistons depuis plusieurs années dans le domaine des OMICs et en particulier le développement d'outils permettant le séquençage d'exomes, de génomes, du transcriptome ou encore l'analyse complète du protéome, a permis des avancées considérables dans le contexte de la découverte de gènes et de mécanismes associés aux maladies rares. N'en doutons pas, bien utilisées dans le cadre d'une réflexion profonde autour de nos pratiques médicales, scientifiques et éthiques, ces technologies en évolution constante, conti-

nueront à produire la connaissance indispensable au plus grand nombre des malades qui nous sont confiés.

Pour autant, l'apport technologique, aussi considérable soit-il, et les avancées thérapeutiques, aussi porteuses d'espoir soient-elles, ne doivent pas faire oublier la nécessaire prise en considération immédiate des besoins et la modification tout aussi indispensable de nos pratiques médicales et scientifiques.

Les grands enjeux de la médecine et de la recherche autour des maladies rares doivent ainsi s'inscrire dans un décloisonnement indispensable des pratiques et des équipes, basé sur des approches et des compétences partagées et autour d'axes majeurs à soutenir en priorité tels que l'identification et le rapprochement de problématiques communes, la transition enfants-adultes, la valorisation et le transfert de technologies, mais surtout le développement de traitements spécifiques innovants ou repositionnés.

Pr Nicolas Lévy

AMU-Inserm UMR_910, Faculté de Médecine, Aix-Marseille
Université, Marseille.

Département de Génétique Médicale, Hôpital d'enfants La Timone,
Assistance Publique -Hôpitaux de Marseille.

Directeur de la Fondation maladies rares
(www.fondation-maladiesrares.org)

Sommaire

Remerciements.....	V
Liste des collaborateurs.....	VII
Préface.....	XI
Avant-propos.....	XV
Abréviations.....	XXV
Table des compléments en ligne.....	XXIX

Partie I

Introduction à la génétique médicale.....	1

Chapitre 1

L'architecture du génome.....	3
Introduction.....	4
Morphologie des chromosomes et architecture du génome.....	5
ADN « satellite » et « isochores ».....	6
Séquences répétées et séquences spécifiques.....	6
ADN répété et concentré dans des régions chromosomiques.....	6
ADN répété et dispersé dans le génome.....	7
ADN spécifique : 40 % du génome est constitué d'ADN spécifique dont 5 % de séquences codantes....	8
Duplications segmentaires (<i>low copy repeats</i>).....	8
Définition et rôle dans l'évolution.....	8
Implication des DS en pathologie et dans la diversité humaine.....	9
Conclusion.....	10

Chapitre 2

Structure et fonction du génome humain : particularité des chromosomes sexuels, inactivation du chromosome X.....	13
Introduction.....	14
Généralités sur les chromosomes sexuels.....	14
Structure des chromosomes sexuels.....	14
Origine et évolution des gonosomes.....	14
Structure des chromosomes X et Y humains.....	15
Particularités du chromosome X.....	15
Particularités du chromosome Y.....	15
Inactivation du chromosome X.....	16

L'inactivation de l'X : un exemple éloquent de régulation épigénétique.....	16
Mise en évidence du chromosome X inactif.....	17
Anomalies de structure du chromosome X.....	18
Pathologie des chromosomes sexuels.....	18
Anomalies de nombre des gonosomes.....	18
Anomalies de structure des gonosomes.....	20
► Liste des compléments en ligne.....	24

Chapitre 3

Structure et fonction du génome humain.....	25
Le projet « Génome humain ».....	26
Carte génétique.....	26
Carte physique.....	27
Séquençage du génome.....	28
Projet HapMap.....	28
Projet 1000 génomes.....	28
Conclusion.....	29
ADN codant et non codant dans le génome humain.....	29
Les gènes codant pour des protéines.....	29
Les gènes transcrits en ARN non codants.....	30
Éléments régulateurs à distance des séquences transcrites....	31
Répertoire des éléments fonctionnels dans le génome humain.....	31
Perspectives.....	32
Polymorphisme du génome humain.....	33
Variants d'un nucléotide (SNV, pour <i>single nucleotide variant</i>).....	34
Microsatellites.....	35
Variants de nombre de copies (CNV, pour <i>copy number variation</i>).....	35
► Liste des compléments en ligne.....	38

Partie II

Génétique formelle.....	39

Chapitre 4

Hérédité monogénique et mosaïcisme.....	41
Introduction.....	42
Généralités.....	42

Définition.....	42
Notions fondamentales.....	42
La dominance et la récessivité des allèles.....	42
L'arbre généalogique.....	42
Hérédité autosomique dominante.....	42
Définition.....	42
Caractéristiques généalogiques des maladies AD.....	43
Exemples de maladie AD.....	43
Particularités de l'hérédité AD.....	44
Mécanismes de la dominance.....	44
Hérédité autosomique récessive.....	44
Définition.....	44
Caractéristiques généalogiques des maladies AR.....	44
Risque de récurrence.....	45
Exemples de maladie AR.....	45
Particularités de l'hérédité AR.....	45
Hérédité liée au chromosome X.....	45
Hérédité récessive liée à l'X (RLX).....	45
Hérédité dominante liée à l'X (DLX).....	46
Mosaïcisme.....	47

Chapitre 5

Génétique des populations.....	49
Introduction.....	50
Fréquences alléliques et estimation de leurs proportions à partir des génotypes.....	50
La loi de Hardy-Weinberg.....	50
Application de la loi de Hardy-Weinberg à l'estimation des fréquences des allèles de gènes autosomiques.....	51
Pour les maladies liées au chromosome X.....	51
Pour vérifier si la loi de Hardy-Weinberg s'applique à une population donnée pour un gène donné.....	51
Facteurs influençant les fréquences géniques – Déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg.....	52
Mutations.....	52
Sélection.....	52
Dérive génétique.....	52
Causes du maintien des maladies génétiques malgré la sélection dans les grandes populations.....	53
L'équilibre mutation-sélection.....	53
L'avantage sélectif des hétérozygotes.....	54
Fréquence élevée de certaines maladies très rares dans de petites populations : l'effet fondateur.....	55
Consanguinité.....	55
Calcul du coefficient de consanguinité.....	55
Consanguinité et maladie récessive autosomique.....	55
Conséquences de la consanguinité à l'échelle d'une population.....	56

Partie III

Génétique chromosomique..... 59

Chapitre 6

Cytogénétique conventionnelle : technique et principales anomalies (anomalies chromosomiques de nombre, anomalies chromosomiques de structure, anomalies des chromosomes sexuels).....	61
Introduction.....	62
Technique.....	62
Cytogénétique constitutionnelle postnatale.....	62
Cas particuliers.....	62
Cytogénétique constitutionnelle prénatale.....	63
Principales anomalies.....	64
Épidémiologie.....	64
Les anomalies de nombre (AN).....	65
Les anomalies de structure (AS).....	66
Indications.....	73
Diagnostic prénatal.....	73
Diagnostic postnatal constitutionnel.....	73
Hématologie, cancérologie.....	73
Quand demander un examen en cytogénétique moléculaire?.....	74

Chapitre 7

Cytogénétique moléculaire.....	75
Introduction.....	76
Cytogénétique moléculaire, aspects techniques.....	76
L'hybridation <i>in situ</i> fluorescente ou FISH (pour <i>fluorescence in situ hybridization</i>).....	76
L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH-array.....	79
Un peu d'histoire.....	79
Principe.....	79
Une variante : les puces à SNP.....	80
Cytogénétique moléculaire, applications cliniques.....	80
La FISH.....	80
L'ACPA.....	82
ACPA et recherche clinique en pathologie constitutionnelle.....	84
Conclusion : la nouvelle cytogénétique.....	84
► Liste des compléments en ligne.....	86

Chapitre 8

Anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides.....	89
Cytogénétique des hémopathies malignes.....	90
Techniques d'étude.....	91

Intérêt clinique de l'analyse génétique dans la prise en charge d'un patient atteint d'hémopathie maligne	91	Unicité ou diversité des mutations	112
Diagnostic : les anomalies cytogénétiques identifiées sont prises en compte pour la classification des hémopathies malignes	91	Mutation unique	112
Suivi : la cytogénétique permet d'apprécier l'évolution de la maladie et l'efficacité d'un traitement (notion de maladie résiduelle)	92	Mutations prépondérantes	112
Cytogénétique et classification pronostique	93	Mutations hétérogènes	112
Perspectives	93	Interprétation des variations identifiées	113
Points clés, hémopathies malignes	94	Conclusion	114
Cytogénétique des tumeurs solides	94	L'essentiel de la question	114
Techniques d'étude	95	▶ Liste des compléments en ligne	116
Le caryotype	95		
La FISH	95	Chapitre 10	
La CGH-array	96	Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène	117
Cytogénétique diagnostique	96	Techniques d'analyse des acides nucléiques :	
Les tumeurs bénignes	96	les outils de base	118
Les sarcomes	96	Extraction des acides nucléiques	118
Les carcinomes	97	Les enzymes de restriction	119
Pronostic	97	Les polymérases	119
Les carcinomes	97	L'électrophorèse	120
Le neuroblastome	98	Le Southern blot	120
Médecine personnalisée	98	Le Northern blot	121
Amplification de <i>HER2</i>	98	PCR, RT-PCR	121
Remaniement de <i>ALK</i> ou <i>ROS1</i>	98	La PCR en temps réel : application de la PCR à l'analyse quantitative	122
<i>FGFR1</i>	98	Séquençage par méthode de Sanger	124
Autres	98	Pyroséquençage	124
Points clés, tumeurs solides	98	Application à l'analyse moléculaire : l'identification des mutations	126
Conclusion générale	99	Méthodes d'identification des mutations ponctuelles	126
		Méthodes d'identification des grands réarrangements géniques	128
		▶ Complément en ligne	131

Partie IV

Génétique moléculaire

Chapitre 9

Anomalies génétiques à l'échelle du gène	103
Les différents types de mutations	104
Substitution nucléotidique	104
Petites délétions ou insertions	104
Grandes délétions, duplications ou inversions	104
Expansion des triplets	105
Mécanismes rares (insertions, conversions géniques, anomalies chromosomiques)	105
Mutations <i>de novo</i> , mosaïques germinales et mosaïques somatiques	106
Conséquences des mutations	107
Perte de fonction	107
Gain de fonction	111
Le gain et la perte de fonction du même gène induisent des phénotypes différents	112

Chapitre 11

Le séquençage de nouvelle génération : principe, applications en diagnostic et perspectives	133
Introduction	134
Principe du séquençage de nouvelle génération	134
Principales étapes du processus de séquençage de nouvelle génération permettant la génération de données de séquençage	134
Principales étapes d'analyse associées au séquençage de nouvelle génération	135
Principales stratégies du séquençage de nouvelle génération	137
Principaux domaines d'application du séquençage de nouvelle génération en génétique médicale	138
Analyse ciblée d'un ensemble de gènes (approche « panel de gènes »)	138
Séquençage de l'exome	139
Séquençage du génome	140
Séquençage à très haut niveau de profondeur de lecture	140
Perspectives	141
▶ Liste des compléments en ligne	143

Partie V

Génétique et pratique médicale..... 145

Chapitre 12

Le conseil génétique 147

Les principes du conseil génétique 148

À qui s'adresse le conseil génétique? 148

Quand? 148

Qui doit donner le conseil génétique? 149

Comment? 149

Le calcul du risque 149

Le risque mendélien est le plus facile à calculer
sous réserve d'un diagnostic sans ambiguïté..... 149On parle de risque empirique lorsque l'estimation
repose sur l'observation de données

et non sur un modèle théorique..... 150

Le risque conditionnel 150

L'information de la parentèle 150

La perception du risque 151

Notion de pourcentage..... 151

Perception du risque..... 151

Prise de décision 151

Le diagnostic prénatal et préimplantatoire 151

► Liste des compléments en ligne..... 151

Chapitre 13

Génétique clinique : examen de l'enfant
porteur d'anomalies du développement..... 153

Introduction 154

Les données de l'interrogatoire 154

Examen clinique..... 154

Principes généraux 154

Aspect général de la face..... 155

Le crâne 155

Le front..... 155

La région oculaire 155

Le nez 156

Le philtrum 156

La bouche 156

Les oreilles 156

Les extrémités..... 156

Le cou et le thorax 157

Le reste de l'examen physique..... 157

Les données de l'imagerie 158

Conclusion..... 158

► Liste des compléments en ligne..... 159

Chapitre 14

Hétérogénéité des maladies génétiques 161

Introduction 162

Hétérogénéité allélique..... 163

Hétérogénéité de locus (ou hétérogénéité
génétique au sens restreint) 165

Pléiotropie ou hétérogénéité phénotypique 165

Hétérogénéité de modèles génétiques..... 166

Hétérogénéité génétique
dans les modèles multigéniques et multifactoriels... 166

Chapitre 15

Diagnostic prénatal et préimplantatoire 167

Introduction 168

Outils du diagnostic prénatal 168

Imagerie 168

Prélèvements de cellules et tissus..... 169

Indications du diagnostic prénatal 171

Dépistage de la trisomie 21..... 171

Antécédent familial d'anomalie chromosomique 172

Antécédent d'enfant

avec une anomalie chromosomique *de novo* 172

Histoire familiale de maladie monogénique 172

Histoire familiale d'une malformation

congénitale 172

Antécédent de déficience intellectuelle 172

Difficultés du diagnostic prénatal 173

Résultat chromosomique ambigu après biopsie
de trophoblaste..... 173Découverte d'un remaniement chromosomique
en apparence équilibré..... 173Découverte d'un marqueur chromosomique
surnuméraire..... 173Découverte fortuite d'une anomalie
chromosomique 174

Interruption médicale de grossesse 174

Diagnostic préimplantatoire..... 174

Indications du DPI 175

Indications du DPI chromosomique 175

Indications du DPI moléculaire..... 175

Diagnostic de sexe dans le cadre d'une maladie
récessive liée à l'X..... 175

DPI associé au typage HLA ou DPI-HLA 175

Techniques de DPI 175

Procédure de FIV..... 175

Méthodes d'analyse génétique du DPI 175

► Liste des compléments en ligne..... 178

Chapitre 16

Dépistage néonatal : éléments à l'usage
des cliniciens généticiens 179Principes généraux d'un dépistage
de population 180Les programmes de dépistage néonatal
en France, leur mode d'organisation..... 180

Les maladies dépistées, leur prise en charge, leur conseil génétique	181
La phénylcétonurie (PCU)	181
L'hypothyroïdie congénitale (HC)	182
L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) par déficit en 21-hydroxylase	183
La mucoviscidose	183
La drépanocytose	184
Le dépistage des surdités permanentes néonatales	185
Organisation du dépistage	185
Le test	185
La prise en charge	186
Conseil génétique	186
Les problèmes éthiques	186
Les évolutions possibles en France	186
Les programmes de dépistage de l'Union européenne et des autres pays	186

Chapitre 17

Le diagnostic présymptomatique dans les maladies neurodégénératives héréditaires à début tardif	189
Diagnostic présymptomatique et médecine prédictive	190
Règles éthiques et recommandations	190
Structure et objectifs de la démarche	191
Expérience dans la MH	192
Attitudes des sujets à risque	192
Caractéristiques des candidats	192
Risque <i>a priori</i> des candidats	192
Données sociodémographiques	192
Motivations des candidats	193
Résultats et conséquences du DPS	193
Extension aux autres maladies neurodégénératives héréditaires	193
Maladies de sévérité comparable à la MH	193
Maladies moins sévères que la MH ou avec bénéfice médical	194
Particularités du DPS chez les mineurs	194
Conclusion	194

Chapitre 18

Dispositions législatives entourant la pratique des tests génétiques	197
Introduction	198
À propos des droits de la personne	198
À propos de la génétique	198
Principes généraux pour la pratique des tests génétiques	199
Primauté de l'individu sur la société	199

Partage de l'information au sein de la famille	199
Droit à l'information	199
Recueil du consentement par écrit	199
Protection des personnes incapables de consentir	199
Droit de ne pas savoir	200
Utilité clinique et qualité des tests	200
Droit à un suivi médical individualisé et au conseil génétique	200
Respect de la confidentialité et de la vie privée	200
L'égalité d'accès aux soins	200
Encadrements spécifiques	201
En raison de la dimension familiale	201
En raison de la dimension prédictive	201
En médecine fœtale et reproductive	202
Conclusion	202

Chapitre 19

Enjeux éthiques, juridiques et psychologiques en génétique médicale	205
Introduction	206
À propos de la génétique appliquée au diagnostic prénatal et préimplantatoire	206
Définition	206
La question de l'eugénisme	206
Les centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN)	207
À propos des approches d'exploration globale du génome	208
Du bon usage des techniques d'exploration du génome en situation de diagnostic : limiter l'incertitude et informer au mieux	208
Tout ce qui est faisable doit-il nécessairement être fait, dans quels buts et avec quels « effets secondaires collatéraux » pour l'individu et pour la société ?	209
Conclusion	210

Chapitre 20

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies mitochondriales	211
La mitochondrie	212
La chaîne respiratoire	212
Le génome mitochondrial	212
Les maladies mitochondriales	213
Présentations cliniques	214
Investigation métabolique	215
Investigation enzymologique	215
Investigation histologique	215
Génétique des maladies mitochondriales	215
Mutations de l'ADN mitochondrial	215
Mutations de gènes nucléaires	216

Exploration moléculaire : intérêt du séquençage de nouvelle génération	218
Conclusion.....	219

Chapitre 21

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées

Introduction	222
Gènes soumis à empreinte	222
Caractéristiques génétiques et épigénétiques des gènes soumis à empreinte.....	223
Nature de l'empreinte génomique	224
Cycle de l'empreinte au cours de la vie	224
Effacement de l'empreinte	224
Apposition de l'empreinte	224
Maintien de l'empreinte	224
Mécanismes de lecture de l'empreinte	225
Méthylation du promoteur	225
Longs ARN non codants antisens.....	225
Enhancers et séquences frontières	225
Silencers	225
Évolution	225
Épimutations, clonage et reprogrammation.....	226
Épimutations.....	226
Clonage et reprogrammation.....	226
Empreinte parentale et pathologies humaines	226
Syndrome de Prader-Willi et syndrome d'Angelman	226
Syndrome de Wiedemann-Beckwith et syndrome de Silver-Russell	227
Pathologie tumorale.....	229
Fonctions des gènes soumis à empreinte parentale	229
Perspectives	229
► Liste des compléments en ligne.....	230

Chapitre 22

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques

Les mutations dynamiques : généralités	234
Syndrome de l'X Fragile (FXS), syndrome tremblement-ataxie associé à l'X fragile (<i>fragile X-associated tremor ataxia syndrome</i> [FXTAS]), insuffisance ovarienne primaire associée à l'X fragile (<i>fragile X-associated primary ovarian insufficiency</i> [FXPOI]).....	236
Clinique, génétique et mécanisme pathologique.....	236
Diagnostic et conseil génétique.....	237
Prise en charge	237
L'ataxie de Friedreich.....	238
Clinique, génétique et mécanisme pathologique.....	238

Diagnostic et conseil génétique.....	238
Prise en charge	238
Maladies à expansion de polyglutamine.....	238
Clinique, génétique et mécanisme pathologique.....	238
Diagnostic et conseil génétique.....	239
Prise en charge	239
Myotonies dystrophiques DM1 et DM2.....	240
Clinique, génétique et mécanisme pathologique.....	240
Diagnostic et conseil génétique.....	241
Prise en charge	241
Une expansion instable d'une répétition hexanucléotide (GGGGCC), cause génétique la plus fréquente de forme familiale de sclérose latérale amyotrophique et de démence frontotemporale.....	241
Clinique, génétique et mécanisme pathologique.....	241
Diagnostic et conseil génétique.....	242
Prise en charge	242
► Complément en ligne.....	246

Chapitre 23

Oncogénétique

Introduction	248
Le cancer, une maladie génétique très particulière	248
Cancers sporadiques et cancers héréditaires.....	248
Bases moléculaires de la transformation maligne.....	249
L'oncogénétique en pratique	250
Quand évoquer une forme héréditaire de cancer?.....	250
Déroulement des consultations d'oncogénétique.....	252
Les cancers du sein et de l'ovaire héréditaires	252
Épidémiologie, déterminisme génétique	252
Les gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	252
Caractéristiques des cancers du sein associées aux mutations des gènes <i>BRCA</i>	253
Caractéristiques des cancers de l'ovaire associées aux mutations des gènes <i>BRCA</i>	253
Autres risques tumoraux associés aux mutations des gènes <i>BRCA</i>	253
Prise en charge médicale des familles avec mutation des gènes <i>BRCA</i>	254
Les nouveaux traitements basés sur les inhibiteurs de PARP....	254
Le cancer colorectal héréditaire.....	255
Épidémiologie, déterminisme génétique	255
Définition nosologique du syndrome de Lynch.....	256
L'altération du système MMR de réparation de l'ADN	256
De la mutation constitutionnelle d'un gène MMR à l'instabilité microsatellitaire au phénotype RER et du phénotype RER au cancer.....	256
Caractéristiques des tumeurs colorectales dans le syndrome de Lynch	257
Caractéristiques des cancers de l'endomètre dans le syndrome de Lynch	258

Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch.....	258
Prise en charge médicale des patients porteurs d'une altération constitutionnelle d'un gène MMR	260

Chapitre 24

Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique	263
Introduction	264
Les bases de données	264
Bases de données de séquences	264
Bases de données de variants	265
Outils bioinformatiques utiles en génétique	267
Séquençage Sanger	267
Séquençage NGS	268
Les outils de prédiction du caractère pathogène des mutations	268
Conclusion	270

Chapitre 25

Perspectives thérapeutiques en génétique médicale	273
Introduction	274
Approches pharmacologiques pour les maladies monogéniques	275
Notions générales	275
Les enzymothérapies substitutives	276
Approches pharmacologiques ciblant directement les anomalies génétiques causales	276
La thérapie cellulaire	277
Définition et notions générales	277
Différents types de cellules-souches utilisables pour la thérapie cellulaire	277
La thérapie génique	279
Définition et notions générales	279
Transfert de gène et vecteurs de thérapie génique	279
Principales stratégies de thérapie génique	280
Thérapie génique <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	281
Conclusion	283
► Complément en ligne	284

Chapitre 26

La pharmacogénétique	285
La pharmacogénétique : définition	286
La pharmacogénétique, un peu d'histoire	286
Applications de la pharmacogénétique	286
Pharmacogénétique des enzymes du métabolisme des médicaments	286
Pharmacogénétique des accidents immunoallergiques médicamenteux	288
Pharmacogénétique des cibles des médicaments	288

Partie VI

Complément ECN	293

Chapitre 27

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie chromosomique : la trisomie 21	295
Incidence	296
Signes cliniques après la naissance	297
À la naissance	297
Complications et évolution	297
Aspects génétiques	300
Mécanisme	300
Conseil génétique	300
Traitement	301
Accompagnement kinésithérapique	301
Accompagnement psychomoteur	301
Accompagnement orthophonique	302
Accompagnement psychologique	302
Accompagnement éducatif	302
Autodétermination	303
Les maisons départementales des personnes handicapées (MDPH)	303
Dépistage prénatal	303
Les marqueurs sériques (MS) du risque de T21	304
La clarté de la nuque du fœtus	304
En pratique	304
Le diagnostic non invasif sur sang maternel	304
Le caryotype fœtal	305
Les signes échographiques de T21 après le premier trimestre	305
Après le diagnostic prénatal	305
Conclusion	305

Chapitre 28

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie génétique : la mucoviscidose	309
Introduction	310
Le gène <i>CFTR</i> et ses mutations	310
Les classes de mutations	311
Les relations génotype/phénotype	312
Apport de la connaissance du gène au diagnostic de la mucoviscidose	313
Le dépistage néonatal de la mucoviscidose	314
Le conseil génétique	314
Prise en charge des couples à risque de 1/4	314
Couples à risque de 1/2	315
Couples à risque a priori de 1/120	315

Le diagnostic de mucoviscidose au cours de la grossesse	316
La prise en charge des couples confrontés à un problème de stérilité par absence de canaux déférents.....	316
Les pathologies associées à des dysfonctionnements de la protéine CFTR (CFTR-RD)	316
Les espoirs thérapeutiques	317
Conclusion.....	317
► Liste des compléments en ligne.....	320

Chapitre 29

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie d'instabilité : le syndrome de l'X fragile....

Introduction	322
Particularités du mode de transmission	322
Pathologie moléculaire.....	322
Phénotype du syndrome de l'X fragile	324
Chez les garçons.....	324
Chez les filles et les femmes conductrices	324
Diagnostic génétique	324
Les atteintes associées aux prémutations du gène <i>FMR1</i>	325
Le FXTAS	325
Les troubles du neurodéveloppement	325
L'insuffisance ovarienne prématurée	325
Le conseil génétique	325
Le diagnostic prénatal et préimplantatoire	326
Conclusion.....	327
► Complément en ligne.....	328

Partie VII

Corrigé

Chapitre 30

Corrigé des entraînements

Entraînement 1.....	332
Chapitre 1	332
Entraînement 2.....	332
Chapitre 2	332
Entraînement 3.....	332
Chapitre 3	332
Entraînement 4.....	332
Chapitre 4	332
Entraînement 5.....	332
Chapitre 5	332

Entraînement 6.....	332
Chapitre 6	332
Entraînement 7.....	333
Chapitre 7	333
Entraînement 8.....	333
Chapitre 8	333
Entraînement 9.....	333
Chapitre 9	333
Entraînement 10.....	333
Chapitre 10	333
Entraînement 11.....	333
Chapitre 11	333
Entraînement 12.....	333
Chapitre 12	333
Entraînement 13.....	334
Chapitre 13	334
Entraînement 14.....	334
Chapitre 14	334
Entraînement 15.....	334
Chapitre 15	334
Entraînement 16.....	334
Chapitre 16	334
Entraînement 17.....	334
Chapitre 17	334
Entraînement 18.....	334
Chapitre 18	334
Entraînement 19.....	335
Chapitre 19	335
Entraînement 20.....	335
Chapitre 20	335
Entraînement 21.....	335
Chapitre 22	335
Entraînement 22.....	337
Chapitre 23	337
Entraînement 23.....	337
Chapitre 25	337
Entraînement 24.....	337
Chapitre 26	337
Entraînement 25.....	337
Chapitre 27	337
Entraînement 26.....	337
Chapitre 28	337
Entraînement 27.....	337
Chapitre 29	337

Postface.....	339

Index.....	341

Abréviations

AAIDD	American Association on Intellectual and Developmental Disabilities	ARS	agence régionale de santé
AAV	vecteurs adénoassociés	AS	anomalies de structure
ACA	anomalies cytogénétiques additionnelles	ASO	<i>allele-specific oligoprobe</i> (diagnostic direct par hybridation spécifique)
AcAc	acétoacétate	ASO	<i>antisense oligonucleotides</i> (oligonucléotides antisens)
ACPA	analyse chromosomique sur puce à ADN (CGH-array)	ATR-X (syndrome)	alpha thalassémie RM lié à l'X
ACRS	<i>allele by amplification created restriction site</i>	AVK	antagoniste de la vitamine K
AD	autosomique dominant	AZF	<i>azoospermia factor</i>
ADN	acide désoxyribonucléique	BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> (chromosomes artificiels de bactérien)
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire	BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
ADNmt	acide désoxyribonucléique mitochondrial	BER	<i>base excision repair</i> (excision des bases)
AdPEO	<i>autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia</i> (ophtalmoplégie progressive externe de transmission autosomique dominante)	BET	bromure d'éthidium
AFDPHE	Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant	BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien	BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
ALFRED	<i>Allele Frequency Database</i>	Brdu	5-bromo-2'-deoxyuridine
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>	BWA	<i>Burrows-Wheeler aligner</i> (aligneur de Burrows-Wheeler)
AMH	<i>anti-müllerian hormone</i> (hormone antimüllérienne)	CAMSP	centre d'action médicosociale précoce
AMM	autorisation de mise sur le marché	CAV	canal atrioventriculaire
AN	anomalies de nombre	CC	<i>Code civil</i>
ANPGM	Association nationale des praticiens de génétique moléculaire	CCR	cancer colorectal
AO	âge osseux	CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
AO	atrophie optique	CFTR-RD	<i>cystic fibrosis related disorders</i> (pathologies associées à des dysfonctionnements de la protéine CFTR)
AR	association régionale	CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> (hybridation génomique comparative)
AR	autosomique récessif	ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i> (immunoprécipitation de chromatine)
ARDPHE	associations régionales pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant	CIMP	(phénotype) <i>CpG island methylator</i>
ARMS	<i>amplification-refractory mutation system</i>	CLIS	classes pour l'inclusion scolaire
ARN	acide ribonucléique	cM	centimorgan
ARNm	acide ribonucléique messager	CMP	centre médicopsychologique
ARNr	acide ribonucléique ribosomique	CMT	cancer médullaire de la thyroïde
ARNt	acide ribonucléique de transfert	CMV	cytomégalovirus
ArPEO	<i>autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia</i> (ophtalmoplégie progressive externe de transmission autosomique récessive)	CNAMTS	Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés
		CNP	<i>copy number polymorphisms</i> (polymorphisme du nombre de copies)

CNV	<i>copy number variation</i> (variabilité du nombre de copies)	FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (facteur de croissance des fibroblastes)
CP	<i>Code pénal</i>	FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i> (hybridation <i>in situ</i> fluorescente)
CPDPN	centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal	FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> (isothiocyanate de fluorescéine)
CR	chaîne respiratoire	FIV	fécondation <i>in vitro</i>
CRA	centre de ressources autisme	FMR1	<i>fragile X mental retardation 1</i>
CRCM	centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose	FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
CSP	<i>Code de la santé publique</i>	FO	fond d'œil
CSPi	cellules-souches pluripotentes induites	FoSTeS	<i>fork stalling and template switching</i> (réplication et commutation de la matrice)
CT	<i>cancer-testis</i>	FRDA	<i>Friedreich's ataxia</i> (ataxie de Friedreich)
Ct	<i>threshold cycle</i>	FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i> (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes)
CYP	cytochrome P450	FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i> (hormone folliculo-stimulante)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	FXPOI	<i>fragile X-associated primary ovarian insufficiency</i> (insuffisance ovarienne prématurée liée à l'X fragile)
DCI	dénomination commune internationale	FXS	<i>fragile X syndrome</i> (syndrome de l'X fragile)
DD	<i>developmental delay</i> (retard de développement)	FXTAS	<i>fragile X associated tremor ataxia syndrome</i> (syndrome tremblement-ataxie associé à l'X fragile)
ddNTP	didésoxyribonucléotides triphosphates	G6PD	glucose-6-phosphate déshydrogénase
DFT	démence frontotemporale	GRACIL	<i>E growth retardation, amino aciduria, cholestasis, iron overload, lactic acidosis, and early death</i> (retard de croissance intra-utérin, aminoacidurie, cholestase, surcharge en fer, acidose lactique et décès précoce)
DGGE	<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i> (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)	GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
DHPLC	<i>denaturing high performance liquid chromatography</i> (chromatographie liquide haute performance dénaturante)	HbS	hémoglobine anormale
DI	déficiences intellectuelles	HC	hypothyroïdie congénitale
DLX	hérédité dominante liée à l'X	HCNE	<i>highly conserved non-coding elements</i> (éléments non codants très conservés)
DM1	dystrophie myotonique type 1	HCS	hyperplasie congénitale des surrénales
DM2	dystrophie myotonique type 2	HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
DNase	désoxyribonucléase	HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
DNN	dépistage néonatal	HGVS	Human Genome Variation Society
DPD	dihydropyrimidine déshydrogénase	HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (antigènes des leucocytes humains)
DPI	diagnostic préimplantatoire	HPST	loi « Hôpital, patients, santé et territoires »
DPN	diagnostic prénatal	HR	<i>homologous recombination</i> (recombinaison homologue)
DPNI	dépistage prénatal non invasif	HRDSB	<i>homologous recombination of double strand DNA breaks repair</i> (réparation des cassures d'ADN double brin par recombinaison homologue)
DPS	diagnostic présymptomatique	HSF	<i>human splicing finder</i>
DS	duplications segmentaires	HSR	<i>homogeneously staining region</i>
DUP	disomies uniparentales	HUGO	Human Genome Organisation
EEG	électroencéphalographie		
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (récepteur de l'epidermal growth factor)		
EIG	effet indésirable grave		
EMM	enzymes du métabolisme des médicaments		
ENaC (canal)	<i>epithelial Na channel</i>		
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA elements</i>		
Enh	<i>enhancer</i>		
ESE	<i>exonic splicing enhancers</i>		
ESS	<i>exonic splicing silencers</i>		
FADH₂	1,5-dihydro-flavine-adénine dinucléotide		
FAIRE Seq	<i>formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements and sequencing</i>		
FFGH	Fédération française de génétique humaine		

ICR	<i>imprinting control regions</i> (contrôle régional de l'empreinte)	MNGIE	mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy (myopathie avec ophtalmoplégie, neuropathie, gastro-intestinale encéphalopathie)
ICSI	injection intra-cytoplasmique	MR	métaboliseurs rapides
IFNL3	interféron lambda 3.	MS	marqueur sérique
IMG	interruption médicale de grossesse	MSCI	<i>meiotic sex chromosome inactivation</i> (inactivation méiotique des chromosomes sexuels)
INCa	Institut national du cancer	MSY	<i>non-recombining Y chromosome male-specific Y-chromosome</i>
IOP	insuffisance ovarienne primitive	MUR	métaboliseurs ultrarapides
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>	NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
IRM	imagerie à résonance magnétique		hydrogène
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>	NAHR	<i>non-allelic homologous recombination</i> (recombinaison homologue non-allélique)
ISE	<i>intronic splicing enhancers</i>	NAT2	N-acétyl transférase de type 2
ISS	<i>intronic splicing silencers</i>	NCBI	National Center for Biotechnology Information
kb	kilobase	NF1	neurofibromatose de type 1
LAF	lampe à fente	NGS	<i>next-generation sequencing</i> (séquençage de nouvelle génération)
LAM	leucémies aiguës myéloïdes	NHEJ	<i>non homologous end joining</i> (extrémités non homologues)
LBSL	<i>leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation</i> (leucoencéphalopathie avec atteinte médullaire et du tronc cérébral et élévation du lactate)	NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
LCC	longueur crâniocaudale	OEA	otoémissions acoustiques
LCR	<i>low copy repeats</i> (duplications segmentaires)	OGE	organes génitaux externes
LHON	<i>Leber hereditary optic neuropathy</i> (atrophie optique de Leber)	OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i>	OMS	Organisation mondiale de la santé
LMC	leucémie myéloïde chronique	ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channel</i> (canal chlorure à rectification sortante)
LOVD	<i>Leiden Open Variation Database</i>	ORL	otorhinolaryngologie
LS	syndrome de Leigh	OTC	ornithine transcarbamylase
LSDB	<i>Locus Specific Databases</i>	OXPHOS	<i>oxidative phosphorylation</i> (phosphorylation oxydative)
MA	million d'années	PAH	phénylalanine hydroxylase
MAF	<i>minor allele frequency</i> (fréquence de l'allèle mineur)	PAPP-A	<i>pregnancy-associated plasma protein A</i> (protéine A plasmatique associée à la grossesse)
Mb	mégabase (million de bases)	PAR	<i>pseudo-autosomal regions</i> (régions pseudo-autosomiques)
MC	malformation congénitale	pb	paire de bases
M-Cen	M-centromère	PC	périmètre crânien
MDPH	maison départementale des personnes handicapées	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (réaction en chaîne par polymérase)
MH	maladie de Huntington	PCU	phénylcétonurie
MI	intermédiaires	PEAA	potentiels évoqués auditifs automatisés
MI	métaboliseurs intermédiaires	Ph-	chromosome Philadelphie-négatif
MIN	<i>microsatellite instability</i> (instabilité microsatellitaire)	PHA	phytohématagglutinine
miRNA	micro-acide ribonucléique	PM	prémutation
ML	métaboliseurs lents	PMA	procréation médicale assistée
MLASA	<i>myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia</i> (myopathie avec acidose lactique et anémie sidéroblastique)	PNMR	Plan national maladies rares
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>	PPi	pyrophosphate
MMR (système)	<i>mismatch repair system</i> (correction des bases mal appariées résultant d'erreurs de la réplication)	PROMM	<i>proximal myotonic myopathy</i> (myopathie myotonique proximale)

PVC	prélèvement de villosités chorales	SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>	snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i> (petit acide ribonucléique nucléaire)
QI	quotient intellectuel	snRNP	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i> (petite ribonucléoprotéine nucléaire)
QMPSF	<i>quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments</i>	SNV	<i>single nucleotide variant</i> (variant d'un nucléotide)
RCC	rémission cytogénétique complète	SOAP	<i>short oligonucleotide analysis package</i>
RCIU	retard de croissance intra-utérin	SPR	séquence de Pierre-Robin
RCP	rémission cytogénétique partielle	SPW	syndrome de Prader-Willi
RER (phénotype)	<i>replication error positive</i> (phénotype d'erreur de réplication)	SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i> (polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin)
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphisms</i> (polymorphismes de longueur de fragments de restriction)	STR	<i>short tandem repeat</i> (microsatellite)
RGO	reflux gastro-cesophagien	T21	trisomie 21
RHC	rémission hématologique complète	TIR	trypsine immunoréactive
RLX	hérédité récessive liée à l'X	Tli	<i>Thermococcus litoralis</i>
RMM	réponse moléculaire majeure	TPMT	thiopurine méthyltransférase
RQTH	reconnaissance de la qualité de travailleur handicapé	tRNA	acide ribonucléique de transfert
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i> (transcription inverse suivie d'une PCR)	TSH	<i>thyroid stimulating hormone</i> (thyroestimuline)
SA	semaine d'aménorrhée	UCSC	University of California Santa Cruz
SA	syndrome d'Angelman	UGT1A1	UDP-glucuronosyl-transférase de type 1
SBMA	<i>spinobulbar muscular atrophy</i> (atrophie musculaire spinobulbaire)	ULIS	unités localisées pour l'inclusion scolaire
SBW	syndrome de Silver-Russell	UMD	<i>Universal Mutation Database</i>
SCA	<i>spinocerebellar ataxia</i> (ataxie spinocérébelleuse)	UV	ultraviolet
SCO	<i>Sertoli cell-only syndrome</i>	VIH	virus de l'immunodéficience humaine
SD	syndrome de Down	VRS	virus respiratoire syncytial
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodécylsulfate de sodium)	WES	<i>whole exome sequencing</i> (séquençage de l'exome entier)
SG	SYBR® Green	WISC	<i>Wechsler Intelligence Scale for Children</i>
SINE	<i>short interspersed nuclear elements</i>	Xa	chromosome X actif
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	XAR	<i>X-added region</i>
SJS	syndrome de Stevens-Johnson	XCR	<i>X-conserved region</i>
SLA	sclérose latérale amyotrophie	Xi	chromosome X inactif
snoRNA	<i>small nucleolar ribonucleic acid</i> (petit acide ribonucléique nucléolaire)	XIC	<i>X-inactivation center</i> (centre d'inactivation de l'X)
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein</i> (petite ribonucléoprotéine nucléolaire)	Xist	<i>X-inactive-specific-transcript</i>
		XL	<i>X-linked</i> (lié à l'X)
		XTR	<i>X-transposed region</i>

Table des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à cet ouvrage. Ils sont indiqués dans la marge par le picto  ainsi que par des flashcodes à la fin des chapitres concernés. Ils proposent des contenus supplémentaires : photos et textes.

Pour accéder à ces compléments, connectez-vous sur **www.em-consulte/e-complement/474521** et suivez les instructions pour activer votre accès.

Partie I

Chapitre 2

Structure et fonction du génome humain : particularité des chromosomes sexuels, inactivation du chromosome X

e-figure 2.2

La région XIC est localisée en Xq13.

e-figure 2.3

Caryogramme partiel des chromosomes 1 et X en Brdu.

Chapitre 3

Structure et fonction du génome humain

e-figure 3.2

Construction de la carte physique.

e-figure 3.3

Cartographie HapMap.

e-figure 3.5

Régulation de l'expression des gènes par des *enhancers* localisés à distance des séquences transcrites.

e-figure 3.6

Polymorphisme de type RFLP (pour *restriction fragment length polymorphism*).

e-figure 3.7

Microsatellites.

e-figure 3.8

Variants de nombre de copies (CNV, pour *copy number variation*).

Partie III

Chapitre 7

Cytogénétique moléculaire

e-figure 7.1

Les sondes.

e-figure 7.2

La multifuorescence.

e-figure 7.3

Principe de l'hybridation *in situ* fluorescente.

e-figure 7.4

Microscopie en fluorescence.

e-figure 7.5

Principe de la CGH sur chromosome.

e-figure 7.6

Principe de la CGH-array.

e-figure 7.7

Principe de la SNP-array.

e-figure 7.8

FISH sur métaphases.

e-figure 7.9

La FISH interphasique.

e-figure 7.10

La vérification par FISH d'une anomalie détectée par CGH-array est indispensable pour établir le diagnostic.

Partie IV

Chapitre 9

Anomalies génétiques à l'échelle du gène

e-figure 9.1

Mécanisme d'apparition des transitions au sein du dimère CpG.

e-figure 9.2

Crossing-over inégaux entre chromosomes homologues.

e-figure 9.3

Recombinaison inégale entre chromatides sœurs.

e-figure 9.4

Recombinaison intrachromatidienne : exemple du gène *F8*.

Chapitre 10

Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène

e-figure 10.3

Représentation des différents types de fluorescence utilisés pour la PCR en temps réel.

Chapitre 11

Le séquençage de nouvelle génération : principe, applications en diagnostic et perspectives

e-figure 11.3

Utilisation du séquençage de nouvelle génération pour étudier des réarrangements génomiques.

e-figure 11.4

Immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage de nouvelle génération.

e-figure 11.5

Mise à profit de la haute profondeur de lecture du séquençage de nouvelle génération pour identifier des séquences diluées.

Partie V

Chapitre 12

Le conseil génétique

« Conseil génétique : exemple de l'évaluation d'un patient avec une déficience intellectuelle »

« Évaluation du risque en conseil génétique »

Chapitre 13

Génétique clinique : examen de l'enfant porteur d'anomalies du développement

e-figure 13.2

Syndrome de Cornelia de Lange.

e-figure 13.3

Syndrome ATR-X.

e-figure 13.4

Syndrome de Smith-Lemli-Opitz.

e-figure 13.5

Syndrome d'alcoolisme fœtal.

e-figure 13.7

Syndrome de Rubinstein-Taybi.

e-figure 13.8

Exemples de polydactylie.

e-figure 13.9

Oligodactylie.

e-figure 13.12

Syndrome de Noonan.

Chapitre 15

Diagnostic prénatal et préimplantatoire

e-figure 15.3

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant un alignement des valves auriculo-ventriculaires suggérant une cardiopathie à type de canal atrioventriculaire chez un fœtus trisomique 21.

e-figure 15.4

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant une interposition linguale (flèche du bas) et des os propres du nez courts (flèche du haut), évocateurs de trisomie 21.

e-figure 15.5

Image échographique 3D réalisée à 22 SA montrant une interposition linguale évocatrice de trisomie 21.

e-figure 15.6

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant une clinodactylie du 5^e doigt évocatrice de trisomie 21.

e-figure 15.7

Image échographique 3D réalisée à 22 SA montrant une oreille bas implantée en rotation postérieure évocatrice de trisomie 21.

e-figure 15.8

Méthodes directe et indirecte d'un diagnostic moléculaire préimplantatoire pour mucoviscidose chez un couple dont chaque membre est hétérozygote pour une mutation p.Phe508del.

e-figure 15.9

Image d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) interphasique obtenue sur blastomère.

Chapitre 21

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées

e-figure 21.1

Complémentarité fonctionnelle des génomes parentaux.

e-figure 21.4

Reprogrammation de la méthylation dans la lignée germinale puis chez l'embryon murin.

e-figure 21.5

Mécanismes de lecture des gènes soumis à empreinte.

e-figure 21.6

Apparition de l'empreinte parentale au cours de l'évolution.

e-figure 21.7

Syndromes de Prader-Willi et d'Angelman.

e-figure 21.8

Mécanismes moléculaires responsables du syndrome de Prader-Willi et du syndrome d'Angelman.

e-figure 21.9

Transmission des mutations d'empreinte : anomalie du *switch* de l'empreinte dans la lignée germinale parentale.

e-figure 21.10

Cluster de gènes soumis à empreinte parentale sur le chromosome 11p15.

Chapitre 22

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques

e-figure 22.1

Quelques exemples de mutations par expansion instable.

Chapitre 25

Perspectives thérapeutiques en génétique médicale

e-figure 25.1

Principe de la translecture de codons stop.

Partie VI**Chapitre 28**

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie génétique : la mucoviscidose

e-figure 28.2

Activation du canal CFTR.

e-figure 28.5

Couples à risque de 1/2.

Chapitre 29

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie d'instabilité : le syndrome de l'X fragile

e-figure 29.2

Aspects moléculaires du syndrome de l'X fragile. Exemple de profils observés à l'aide de la technique AmpliDeX, sur séquenceur capillaire.

This page intentionally left blank

Partie



Introduction à la génétique médicale

PLAN DE LA PARTIE

L'architecture du génome	3
Structure et fonction du génome humain : particularité des chromosomes sexuels, inactivation du chromosome X	13
Structure et fonction du génome humain	25

L'architecture du génome

Serge Romana

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	4
Morphologie des chromosomes et architecture du génome	5
ADN « satellite » et « isochores »	6
Séquences répétées et séquences spécifiques	6
Duplications segmentaires (<i>low copy repeats</i>)	8
Conclusion	10

Introduction

L'apparition de la vie sur Terre, il y a 3,5 milliards d'années, est consubstantielle de celle des acides nucléiques, ARN et ADN. Les propriétés du vivant : la reproduction et la croissance, sont liées aux acides nucléiques. Ils sont dépositaires du « logiciel », le code génétique, permettant la synthèse des protéines, la croissance cellulaire, l'embryogenèse, le fonctionnement des organes, le vieillissement... Complexés à des protéines basiques, les histones, ils forment les chromosomes circulaires des procaryotes, ainsi que les chromosomes linéaires des eucaryotes [1]. Il y a 540 millions d'années, c'est l'explosion cambrienne [2] au cours de laquelle, l'essentiel des plans anatomiques apparaît. C'est le grand départ de la diversité sur notre Terre qui, après cinq extinctions massives [3, 4], conduira aux formes de la vie que nous connaissons actuellement. La base de cette évolution est la formidable plasticité de l'ADN dont la complexité ira en

s'accroissant (figure 1.1). Extraordinaire aventure du vivant, en premier lieu de son « logiciel biochimique », l'ADN, molécule ayant les ressources pour permettre au « vivant » de s'adapter aux conditions environnementales; fantastique histoire qui conduit aujourd'hui à l'existence d'un nombre de molécules d'ADN en constante expansion et dont la taille totale (si toutes les molécules d'ADN étaient mises bout à bout) serait de 10^{12} années-lumière soit 10 fois le diamètre connu de l'univers [5]. La vie ne serait-elle qu'une vaste usine à fabriquer des acides nucléiques?

Comme le dit Michael Lynch :

« Malgré les aspects uniques de la biologie humaine, notre génome n'est pas particulièrement remarquable quant à sa structure ou l'organisation de ses gènes, au moins du point de vue multicellulaire, et il a la plupart des caractéristiques qui sont la marque de l'évolution des génomes eucaryotes [6]. »

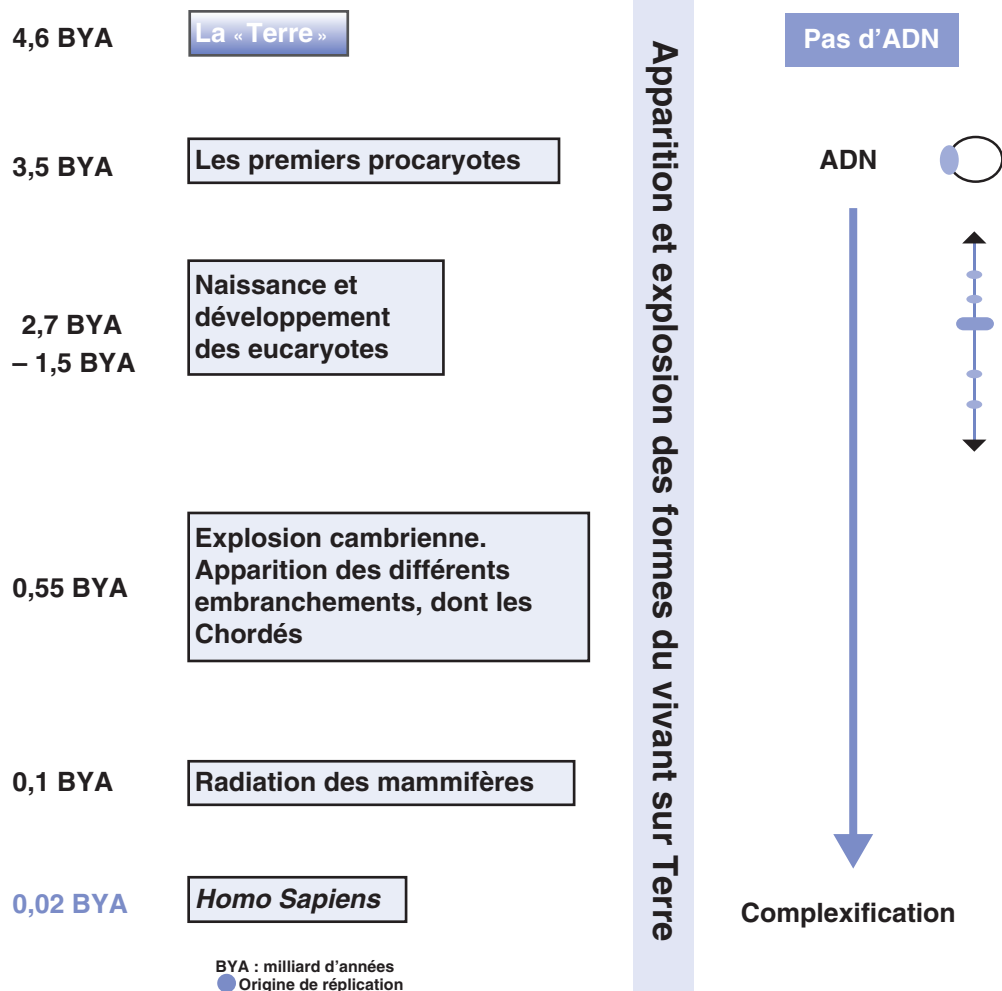


Figure 1.1

Apparition et explosion des formes du vivant sur la terre.

Autrement dit, notre génome contient dans son architecture les marques de l'évolution.

L'objet de ce chapitre est de présenter l'architecture de notre génome en mettant en perspectives le rapport entre ces éléments architecturaux et l'apparition de la diversité interspèce et interhumaine. L'observation en microscopie optique des centromères et des bandes sur les chromosomes est une première indication de l'existence d'une architecture de la chromatine le long de la fibre chromatinienne. Les expériences de dénaturation-renaturation, d'ultracentrifugation de l'ADN génomique, de FISH ainsi que le séquençage du génome dévoileront la base de cette architecture.

Morphologie des chromosomes et architecture du génome

L'étude du caryotype montre qu'au sein d'une espèce, chaque paire chromosomique a une morphologie (ordonnement et intensité des bandes ainsi que la position des centromères) qui lui est propre [7]. Cette spécificité morphologique intra-espèce suggère l'existence d'une architecture de la molécule d'ADN le long de l'axe chromosomique spécifique de chaque paire chromosomique. La comparaison interspèce des chromosomes en prophase (1000 bandes) révèle par ailleurs une similitude de cette architecture d'autant plus forte que les espèces sont proches sur le plan phylogénétique. Chez les *Hominidae* (*Homo sapiens*, chimpanzés, gorilles et orangs-outans), on observe que les humains ont 13 paires de chromosomes semblables (3, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 19, 20, 21, 22, X et Y) avec les chimpanzés, 9 semblables (3, 6, 7, 8, 11, 13, 19, 21, 22, X et Y) avec les gorilles et 8 semblables (5, 6, 12, 13, 14, 19, 21 et 22) avec l'orang-outan. Les différences morphologiques des autres paires résultent principalement d'anomalies intrachromosomiques (inversions péricentriques et paracentriques) et de rares remaniements interchromosomiques. Ainsi, le chromosome 2 des humains provient de la fusion de deux chromosomes des grands singes appelés 2p et 2q suivis de l'inactivation d'un des centromères [8]. Ces comparaisons morphologiques ont permis, dès le début des années 1980, d'imaginer l'existence d'un caryotype d'un ancêtre commun aux *Hominidae* dont certains remaniements intrachromosomiques et interchromosomiques ont accompagné l'apparition des humains, chimpanzés, gorilles et orangs-outans.

L'avènement des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescences (FISH, pour *fluorescence in situ hybridization*) et l'utilisation de sondes de peintures chromosomiques, puis de sondes étagées spécifiques couvrant l'ensemble de différents génomes de primates et d'autres mammifères a montré l'existence de « blocs génomiques conservés » ou « segments synthéniques » interspèces de taille plus ou moins conservée selon la distance phylogénétique chez les mammifères. Des cartes de conservation de synthénie de chromosomes entiers et de grands segments chromosomiques de différents mammifères euthériens (clade de mammifères ayant émergé il y a 160 millions d'années) ont été établies. C'est ainsi que l'hybridation des sondes de peinture des chromosomes, 13, 17, 20 et X humains ne peignent qu'un seul chromosome (c'est le cas pour l'X) ou que des bras entiers chromosomiques de différentes espèces de mammifères. À partir de ces données, différents scénarios basés sur des mécanismes de fission-fusion, de translocations, d'insertions, d'inversions péricentriques et paracentriques et de *shifts* de centromères ont été élaborés pour expliquer les différences d'architecture « phylogénétiques » des caryotypes de différentes espèces. Par exemple, lors de la divergence des prosimiens et des simiens, de nouveaux chromosomes furent construits chez les simiens : les acrocentriques 16p et 7p par fission d'un métacentrique, le chromosome 19 par fusion de deux chromosomes acrocentriques et les chromosomes 12 et 22 à la suite d'une translocation. La séparation des singes du Nouveau Monde et de ceux de l'Ancien Monde fut caractérisée par l'existence chez ces derniers de la création du chromosome 16 par fusion de deux acrocentriques (dont le chromosome 16p caractéristique des simiens), du chromosome 7 par fusion des deux acrocentriques 7a et 7p, et la fission d'un chromosome 3/21 en chromosome 3 et 21. Plus tard, chez les grands singes apparaîtront les chromosomes 14 et 15 par fission d'un métacentrique et, enfin, chez les humains, une fusion de deux acrocentriques générera le chromosome 2 [9–12].

Ainsi, la morphologie des chromosomes humains observée au microscope optique reflète une architecture de la fibre chromosomique héritée d'une longue évolution des molécules d'ADN chromosomiques. Quelles sont les bases moléculaires de cette architecture? D'autres techniques telle l'ultracentrifugation de l'ADN, des expériences de dénaturation-renaturation et le séquençage permettront de les découvrir.

ADN « satellite » et « isochores »

La densité des fragments d'ADN génomique d'une bactérie ou d'un virus, après ultracentrifugation sur chlorure de césium, se distribue selon une courbe de Gauss indiquant une densité (c'est-à-dire une répartition des bases GC et AT) homogène de tous ces fragments [13]. À l'inverse, celle d'ADN génomique de métazoaires montre l'existence de plusieurs courbes, une principale (composée de la majeure partie de l'ADN) et d'autres appelées « satellites », signifiant l'existence de fractions d'ADN caractérisées par des densités différentes. Ces densités sont spécifiques de chaque espèce (figure 1.2).

La base moléculaire de l'existence de ces fractions est la différence de contenu en base GC. Plus un génome sera riche en bases GC, plus sa densité sera élevée. La fraction principale chez l'homme a une densité moyenne de 1,7 g/mL. À côté de cette fraction principale, on observe de petites fractions, appelées « satellites », de 1,69 g/mL, 1,688 g/mL et 1,671 g/mL.

Dans les années 1970, les travaux de l'équipe de Giorgio Bernardi ont démontré que la bande principale pouvait être, après ultracentrifugation en sulfate de chlorure de césium couplé à des ions d'argent ($C_{52}SO_4/Ag^+$), fractionnée en cinq sous-fractions. Ces sous-fractions sont composées de régions d'environ 300 kb de densité homogène, appelés isochores. On distingue les isochores L1, L2, H1, H2, H3 avec un contenu en GC respectivement de 38 %, 38–42 %, 42–47 %, 47–52 % et 52 % (L pour *light* et H pour *heavy*). Le séquençage du génome a confirmé l'existence de ces isochores (revue dans [14]).

Ainsi l'ADN génomique est une mosaïque d'isochores, régions d'environ 300 kb, de composition en GC relativement homogène. La localisation physique de ces isochores a été révélée par des expériences de FISH en utilisant ces différentes fractions d'ADN comme sondes sur des chromosomes. Les isochores L1 et L2 sont concentrées au niveau des bandes G, qui sont pauvres en gènes et dont

l'ADN se réplique tardivement en phase S et les isochores H au niveau des bandes R qui sont riches en gènes de ménage et dont l'ADN se réplique en première partie de phase S [15]. Les travaux de cette équipe ont également montré que le nombre et le pourcentage relatif de familles d'isochores étaient variables selon les espèces. En effet, si les cinq familles d'isochores sont retrouvées dans le génome humain, elles ne sont que quatre chez la souris, deux chez le poisson zèbre (famille L1 et L2) et un seul chez *Saccharomyces cerevisiae* (L2) [16].

Séquences répétées et séquences spécifiques

La cinétique de réassociation de fragments d'ADN de bactériophage après dénaturation par la chaleur s'effectue selon une courbe unique indiquant une seule dynamique de renaturation [17]. Chez les métazoaires, cette réassociation se déroule en trois phases, indiquant l'existence de trois fractions d'ADN : l'une se renaturant rapidement, une autre tardivement et une troisième de façon intermédiaire. La première fraction est composée de séquences d'ADN très répétées dans le génome, la deuxième de séquences d'ADN moyennement répétées et la dernière de séquences uniques (figure 1.3). Des expériences de FISH, le séquençage de ces fractions génomiques puis le séquençage de l'ensemble du génome de nombreuses espèces, dont l'homme, ont déterminé la nature de ces trois types de séquence, leurs proportions dans le génome ainsi que leur localisation sur les chromosomes.

ADN répété et concentré dans des régions chromosomiques

La première fraction à se réassocier représente 10 à 15 % du génome. Elle est constituée de séquences extrême-

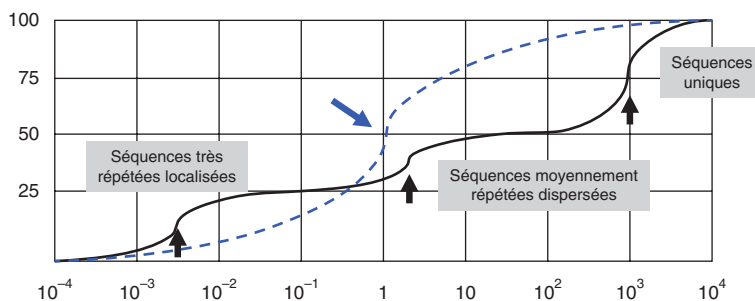


Figure 1.2

Courbe de dénaturation-renaturation.

En bleu : ADN de procaryote. En noir : ADN de mammifères.

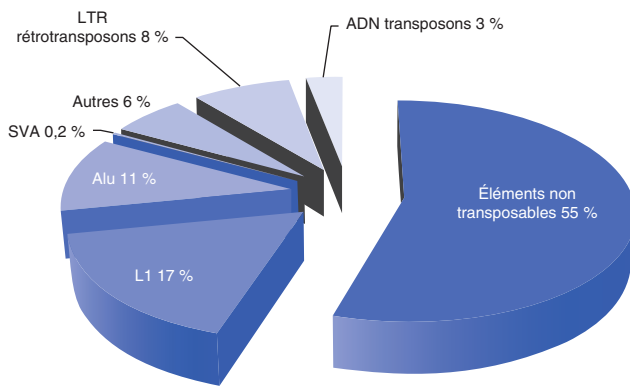


Figure 1.3

Les différentes fractions d'ADN humain.

Selon Cordeaux et Batzer, 2009.

ment répétées qui correspondent en majorité à l'ADN satellite. Les plus connues sont les satellites alphaïdes qui sont des répétitions en tandem de 171 paires de bases constituant environ 5 % du génome [18]. Ces séquences sont localisées au niveau des centromères de tous les chromosomes où elles sont répétées des centaines, voire des milliers de fois selon les chromosomes. Leur présence va générer une conformation de la chromatine qui favorise le recrutement de protéines constituant le kinétochore, structure au niveau de laquelle vont se fixer les fibres du fuseau mitotique.

Les télomères sont également constitués de plusieurs milliers de répétitions de la séquence TTAGGG. Ces répétitions télomériques permettent aux extrémités chromosomiques de constituer des boucles protégeant les chromosomes de recombinaisons terminales.

Les autres séquences satellites sont les satellites β , 1, 2 et 3 constitués de répétitions en tandem, mais de plus petite taille (de 5 à 68 par famille). Ces séquences satellites sont également concentrées par milliers ou millions dans les régions centromériques, péricentromériques ou encore au niveau des bras courts des chromosomes acrocentriques (séquences palindromiques), ainsi qu'au niveau du bras long du chromosome Y. Ces séquences ne sont pas codantes et sont caractéristiques des chromosomes linéaires des métazoaires [19].

Une petite partie des séquences très répétées est codante. C'est l'ADN ribosomique. Cet ADN est concentré au niveau des bras courts des chromosomes acrocentriques. Dans les noyaux en interphase de cellules actives d'un point de vue transcriptionnel, les bras courts des chromosomes acrocentriques se regroupent et la forte activité de transcription des ARN ribosomiques est visible en microscopie optique sous la forme de nucléoles.

ADN répété et dispersé dans le génome

La deuxième fraction à se renaturer est constituée de séquences moyennement répétées et dispersées dans le génome [20]. Ce sont les « éléments transposables » (TE) qui constituent 45 % du génome. Les TE sont composés de deux grandes familles : les DNA transposons, 3 % du génome (séquences d'ADN capables de s'exciser et de s'insérer vers d'autres sites) et les rétrotransposons. Ces derniers se propagent par l'intermédiaire d'une transcription en ARN qui vont être par la suite rétrotranscrits dans le génome. On distingue deux groupes de rétrotransposons selon qu'ils contiennent ou non des LTR (*long terminal repeats*). Ceux qui en contiennent sont des rétrovirus endogènes. Ils constituent 8 % du génome. Les autres, les « non- rétrotransposons », sont constitués principalement de deux familles : les *LINE 1* (*long interspersed nuclear elements 1*) et les séquences *Alu*. Elles constituent près de 30 % du génome humain (figure 1.4).

- Les *LINE 1* ou L1 sont apparues dans le génome des eucaryotes il y a 600 millions d'années. Mais c'est dans le génome des mammifères (et non dans celui des poissons et des oiseaux) que les L1 se sont amplifiés et dispersés, il y a 100 à 120 millions d'années. Ce sont des séquences d'en moyenne 6 000 à 8 000 pb dont le nombre de copies est d'environ 500 000 dans le génome humain, dont elles constituent 17 % du total. Elles sont riches en séquences AT et sont concentrées dans les isochores L1 et L2 (bandes G). Les *Line1* codent une *RNA-binding protein*, une endonucléase et une *reverse transcriptase* (TPRV) grâce auxquelles elles sont capables d'assurer de façon autonome leur rétrotransposition.

- Les séquences *Alu* font partie des *SINE* (*short interspersed nuclear elements*). Ce sont des séquences de 300 pb répétées plus de 1 million de fois dans le génome humain. Elles représentent environ 10 % du génome. Elles dérivent du gène *7SL RNA* qui est la partie ARN de la particule de reconnaissance du signal (SRP) (protéine qui dirige le trafic cytoplasmique des protéines sécrétées). Ces séquences *Alu* se sont propagées par rétrotranscription dans le génome d'un ancêtre commun aux primates et aux rongeurs, il y a plus de 65 millions d'années. Riches en GC, elles sont concentrées dans les isochores H (bandes R sombres). Elles utilisent la machinerie de rétrotranscription des séquences L1 pour se rétrotransposer. Leur apparition est donc postérieure à celle des séquences L1.

Le dynamisme de ces séquences a « impacté » l'architecture du génome : répartition selon les isochores, accumulations aux bornes de remaniements chromosomiques

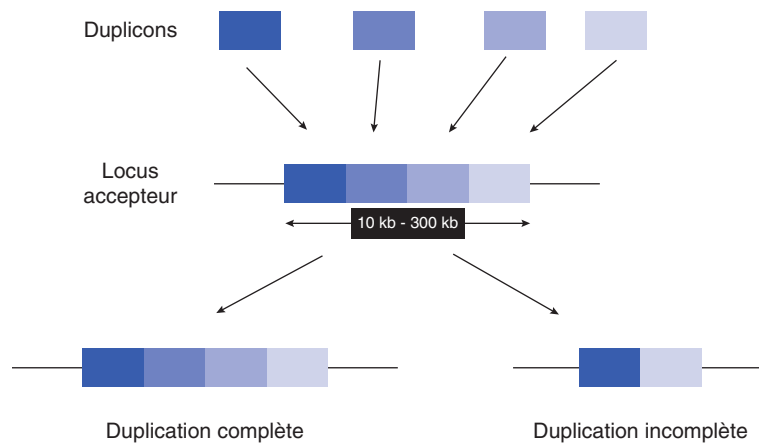


Figure 1.4

Les duplications segmentaires.

Selon Semonce et Eichier, 2001.

(duplications segmentaires, délétions, insertions) et sur l'évolution par création de nouveaux gènes par transduction de séquences se situant près des sites d'intégration. L1 et *Alu* ont contribué à une augmentation de 750 millions de paires de bases dans le génome humain (8 Mb, durant les 6 derniers millions d'années) soit 25 % du génome humain. Ces séquences ont été actives durant ces 12–40 millions dernières années. Il a été calculé, qu'il y a 40 millions d'années, il survenait une insertion de L1 et d'*Alu* toutes les naissances chez les primates contre 1 toutes les 20 naissances actuellement chez les humains. Aujourd'hui, 99,8 % des L1 sont inactives, fossilisées, incapables de rétrotransposition, du fait de la présence de délétions dans leur partie V', d'inversions et de mutations dans les régions codantes. On estime que seules 80 à 100 séquences L1 sont compétentes dont 10 % très actives. Ces dernières sont capables de générer, lors de leur insertion, des ruptures de phase ouverte de lecture et donc des maladies génétiques, mais aussi du mosaïcisme dans les progéniteurs neuronaux [21], participant ainsi à la différenciation neuronale (revue dans [22–24]).

ADN spécifique : 40 % du génome est constitué d'ADN spécifique dont 5 % de séquences codantes

La troisième fraction à se renaturer est composée de séquences uniques. Elle représente 40 % du génome. Mais seule une petite partie, 5 % (chez les mammifères), code des protéines. Le reste (35 % du génome) est constitué de séquences non codantes, introns ou régions intergéniques de taille plus ou moins grande. Certaines de ces régions d'une taille de plusieurs mégabases sont appelées « désert

génique ». Longtemps considéré comme de « l'ADN pou-belle » (*junk DNA*), on sait aujourd'hui grâce au projet ENCODE [25] que ces régions contiennent en fait 18 400 gènes codant des RNA non traduits et de nombreux éléments de régulation de la transcription.

Duplications segmentaires (*low copy repeats*)

Définition et rôle dans l'évolution

Au cours de l'évolution des espèces, l'ADN chromosomique a été l'objet de remaniements considérables liés à des mécanismes structuraux (duplications de larges segments chromosomiques, translocations, délétions, insertions, etc.) ou à des anomalies de ségrégations chromosomiques qui ont modelé les génomes de différentes espèces, leur ont donné leurs caractéristiques et accompagné la spéciation. C'est ainsi qu'une double amplification totale de génome 2R-WGD (*two rounds of whole-genome duplication*) suivie de perte de chromosome marque le passage des invertébrés aux vertébrés, une première il y a 400 à 450 millions d'années avec l'apparition des premiers chordés (*Pikaia*), puis une deuxième il y a 300 à 250 millions d'années lors de l'émergence des poissons et des amphibiens [26–28]. Par un autre mécanisme, la spéciation chez les grands primates s'est accompagnée de « la propagation » dans leur génome, d'un type de séquences : les « duplications segmentaires » ou *low copy repeats* (LCR).

C'est le séquençage des points de cassure de microremaniements (c'est-à-dire de gain ou de perte de matériel

génomique d'une taille inférieure à 5 Mb) récurrents qui a révélé l'existence de blocs de séquences particulières [29]. Elles sont de grande taille, entre 1 kb et plus de 200 kb et sont au moins en deux exemplaires dans le génome humain avec chacune une similitude de plus de 95 %. Elles peuvent être interchromosomiques, mais sont majoritairement intrachromosomiques. Elles sont présentes sur tous les chromosomes avec des concentrations plus importantes sur certains chromosomes (12 % dans le chromosome Y, 6 % dans le chromosome 22, 4,5 % dans le chromosome 16) et 3 à 5 fois plus concentrées dans les régions péricentromériques et subtélomériques. Au total, elles occupent près de 150 Mb, soit près de 5 % du génome humain. À la différence des duplications segmentaires (DS) des autres mammifères qui surviennent en tandem, les duplications segmentaires des humanoïdes sont séparées par des régions d'euchromatine de taille variant de 0,5 Mb à plus de 3 Mb. Leurs tailles sont pour la majorité supérieures à 10 kb, alors que celles retrouvées chez d'autres vertébrés (oiseaux) et chez les invertébrés (par exemple chez *Cænorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*) font moins de 10 kb pour plus de 99 % d'entre elles. D'un point de vue structural, il est aujourd'hui admis qu'une duplication segmentaire survient en deux étapes : une première duplication d'un petit segment chromosomique, appelé *duplicon* est transférée au niveau d'un *site accepteur* d'un autre chromosome. Ce « site accepteur » va ensuite recevoir plusieurs duplicons se disposant en tandem. Se forme ainsi une « structure mosaïque » composée de plusieurs duplicons d'origines chromosomiques différentes. Dans un deuxième temps, cette structure va se dupliquer complètement ou pas un certain nombre de fois (2–5 en général) soit sur le même chromosome créant les DS intrachromosomiques ou sur un autre chromosome, créant les DS interchromosomiques. Des remaniements (amplifications, inversions, délétions) peuvent ensuite survenir au sein des DS augmentant la complexité de ces structures [30, 31].

La comparaison de la séquence des génomes des humains et des grands singes a montré l'existence d'une « explosion » de ces duplications segmentaires il y a 35 millions d'années avec des spécificités (en termes de longueur et de nombre de duplications) propres à chacune des lignées humanoïdes d'autant plus proches que les espèces sont rapprochées sur le plan phylogénétique. C'est ainsi que le nombre de DS partagées entre les humains et les chimpanzés (près de 66 %) est plus important que le nombre de DS communes aux humains et aux gorilles et aux orangs-outans. Le séquençage de ces DS a montré qu'elles sont composées de gènes, de familles de gènes, de pseudo-gènes et de séquences rétrovirales. Nombreux sont les gènes des DS que l'on

retrouve donc chez les chimpanzés et les humains. Ceux-ci sont liés à l'adaptation humaine (amylase, neurotransmetteurs, contraction musculaire, etc.). La différence entre les deux espèces est celle en matière de nombre de duplicons (et donc de gènes) qui peut exister entre les DS communes aux deux espèces. D'autres sont spécifiques (en termes de séquence ou de nombre de répétitions) aux autres grands primates. Il est aujourd'hui admis qu'à la différence du taux de mutation et de l'activité des rétrotransposons, dont le ralentissement est caractéristique de l'évolution chez les primates, c'est l'intense activité des DS avec la variation du taux d'expression des différents gènes qu'elles contiennent (liés aux nombres de copies) qui a été le principal moteur de la différenciation des primates [32].

Implication des DS en pathologie et dans la diversité humaine

Les DS intrachromosomiques identiques à plus de 95 % peuvent catalyser des recombinaisons homologues non alléliques qui génèrent des microremaniements récurrents des régions euchromatiques comprises entre deux DS. Ces remaniements sont caractéristiques des humanoïdes [33].

Par ailleurs, par *crossing-over* inégal, les DS sont le siège d'amplification ou de pertes de régions intra-DS qui peuvent être riches en gènes, entraînant des différences dans le taux d'expression de certains gènes entre des individus ou des ethnies humaines [34]. Ces déséquilibres génomiques sont détectés lors des expériences de CGH-array ou de SNP-array sous forme de *copy number variation* (CNV) que l'on trouve dans des populations sans maladies neuropsychiatriques ou malformatives [35]. Lorsqu'elles ont une fréquence de plus de 1 % dans la population générale, ces CNV sont appelés *copy number polymorphisms* (CNP). On en compte aujourd'hui 14 000 dans le génome humain dont la majorité est localisée dans les DS [36]. Ces CNP jouent un rôle déterminant dans l'adaptation des populations humaines à leur environnement. Ainsi, le nombre de copies des CNP contenant le gène *CCL3L1* (codant pour la *chemokine CC chemokine ligand 3-like 1*), localisé en 17q12, et celui de la *FCGR3B* (codant pour un des récepteurs de la partie constante des immunoglobulines), localisé en 1q23.3, est associé à la capacité de résistance à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ainsi qu'au risque de développement de maladies auto-immunes tels la maladie de Kawasaki, le lupus érythémateux disséminé ou la polyarthrite rhumatoïde [37]. C'est par exemple le cas pour le CNP contenant le gène *UGT2B17* localisé en 4q13.2. Ce gène code pour l'uridine diphospho-(UDP)-glucuronosyltransférase,

qui transforme la testostérone en testostérone glucuronide afin qu'elle soit éliminée par voie urinaire. Ce CNP possède trois allèles de 0, 1 et 2 copies. L'allèle 0 est retrouvé chez 66 % des Coréens contre 9 % chez les Suédois, alors que l'allèle 2 est de 10 % chez les Coréens et de 50 % chez les Suédois. De ce fait, 93 % des Suédois ont des taux d'excrétion de testostérone glucuronide élevée, contre seulement 27 % des Coréens. Une telle variation doit être prise en compte dans l'interprétation des tests de dopage chez les sportifs et peut expliquer la différence de réponse aux traitements par la testostérone [38]. De même, le locus des gènes de l'amylase 1A et 2B se situe sur un CNP dont le nombre de copies varie de 2 à 15 dans les populations humaines. Les populations dont les ancêtres ont eu une alimentation riche en amidon sont celles dont la fréquence du nombre de copies est la plus élevée [39].

Conclusion

Inexistant lors des premiers temps de la Terre, l'ADN, molécule capable de se répliquer, a su se modifier, se complexifier et être le *substratum* biochimique du vivant sur la planète.

Le génome humain est le témoin de cette évolution. Il est composé de 23 paires de molécules d'ADN organisées en fibres chromatiniennes qui se condensent en 23 paires de chromosomes à la mitose et possède une architecture spécifique de chaque paire chromosomique. Différentes transformations architecturales (linéarisation des chromosomes circulaires de procaryotes, duplications de larges segments génomiques, double amplification de l'ensemble de génome lors du passage des invertébrés aux vertébrés, remaniements chromosomiques lors de la radiation des mammifères, envahissement par des rétrotransposons, duplications segmentaires chez les primates) ont accompagné les modifications qualitatives (mutations) pour donner le génome des *Homo sapiens* (figure 1.5). Celui-ci est en perpétuel changement comme l'indiquent l'existence des 38 millions de SNP, les 1,4 million de petites insertions et délétions (in/del) et les 14 000 CNV retrouvées à des fréquences différentes dans le génome de différentes populations humaines. Cette plasticité du génome et sa conséquence, l'évolution des espèces, ont les mêmes mécanismes [40] que ceux des anomalies génétiques, et particulièrement chromosomiques, étudiées en pathologie humaine qui ne sont donc que le tribut que nous payons à l'évolution.

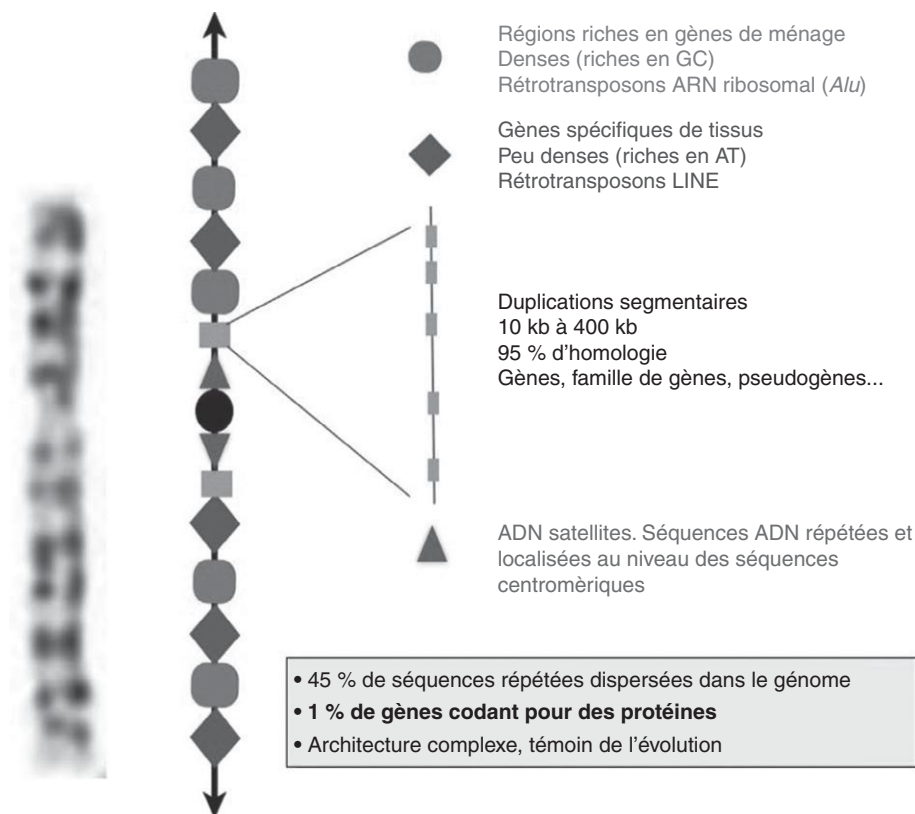


Figure 1.5

Architecture d'un chromosome humain.

ENTRAÎNEMENT 1 QCM-QCS

QCM 1

Le génome humain actuel est composé :

- A. De régions contenant des séquences de type *Alu*
- B. Des séquences de type T2
- C. Des séquences de type *LINE 1*
- D. Des séquences de type *SINE*
- E. Des séquences spécifiques codantes pour des protéines

QCM 2

Le génome a évolué grâce aux mécanismes suivants :

- A. Duplications
- B. Amplifications de génomes entiers
- C. Fusion
- D. Fission
- E. Envahissement par des ARN

QCM 3

Les duplications segmentaires

- A. Sont inter- et intrachromosomiques
- B. Sont concentrées au niveau des bandes G
- C. Sont principalement en tandem chez les humains
- D. Ont une taille de plus d'une mégabase

E. Sont composés de fragments de différents chromosomes appelés duplons

QCM 4

Les séquences alphasatellites et β -satellites :

- A. Codent des protéines
- B. Sont concentrées au niveau des télomères
- C. Constituent la fraction principale de l'ADN humain après ultracentrifugation en chlorure de césium
- D. Sont concentrées au niveau des centromères et des régions péri-centromériques
- E. Sont parmi les premières à se réassocier dans des expériences de dénaturation-renaturation

QCS 1

Les rétrotransposons *Alu* et *LINE 1*

- A. Constituent l'essentiel de l'ADN des humains
- B. Sont composés en majorité de séquences rétrovirales
- C. Ont envahi l'ADN de toutes les espèces il y a 100 millions d'ADN
- D. Sont concentrés dans les régions péri-centromériques
- E. Sont respectivement concentrés dans les isochores H et L

Références

- [1] Volff JN, Altenbuchner J. A new beginning with new ends : linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 186(2) : 143–50.
- [2] Erwin DH, Laflamme M, Tweedt SM, et al. The Cambrian conundrum : early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science* 2011; 334(6059) : 1091–7.
- [3] Smith P, Harper DT. Earth science. Causes of the Cambrian explosion. *Science* 2013; 341(6152) : 1355–6.
- [4] Raup DM. The role of extinction in evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(15) : 6758–63.
- [5] Lynch M. The origins of the genome architecture. Sunderland. Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2007. p. 3.
- [6] Lynch M. The origins of the genome architecture. Sunderland. Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2007. p. 43.
- [7] Caspersen T, Farber S, Foley GE, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1967; 49 : 219–22.
- [8] Yunis JJ, Prakash O. The origin of man : a chromosome pictorial legacy. *Sciences* 1982; 215 : 1525–30.
- [9] Chowdhary BP, Raudsepp T, Frönidke L, et al. Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by zoo-fish. *Genome Res* 1998; 8 : 588–9.
- [10] Wienberg J, Stanyon R. Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7 : 784–91.
- [11] Wienberg J. Fluorescence in situ hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108 : 139–60.
- [12] Stanyon R, Rocchi M, Capozzi O, et al. Primate chromosome evolution : Ancestral karyotypes, marker order and neocentromere. *Chromosome Res* 2008; 16 : 17–39.
- [13] Meselson M, Stahl FW, Winograd J. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1957; 43(7) : 851–8.
- [14] Bernardi G. Structural and evolutionary genomics. In : *Natural Selection in Genome Evolution*. Elsevier; 2005. p. 13–4.
- [15] Costantini M, Clay O, Auletta F, et al. An isochore map of human chromosomes. *Genome Res* 2006; 16 : 536–41.
- [16] Costantini M, Alvarez-Valin F, Costantini S, et al. Compositional patterns in the genomes of unicellular eukaryotes. *Genomics* 2013; 14(755) : 1–12.
- [17] Britten RJ, Kohne DE. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 1968; 161(841) : 529–40.
- [18] Rudd MK, Wray GA, Willard HF. The evolutionary dynamics of α -satellite. *Genome Res* 2006; 16 : 88–96.
- [19] Wayne JS, Willard HF. Human beta satellite DNA : genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(16) : 6250–4.
- [20] Britten RJ, Kohne DE. Repeated sequences in DNA. *Science* 1968; 161(841) : 529–40.
- [21] Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, et al. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 2005; 435 : 903–10.
- [22] Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009; 10(10) : 691–703.

- [23] Babushok DV, Kazazian Jr HH. Progress in understanding the biology of the human mutagen *LINE-1*. *Hum Mutat* 2007; 28(6) : 527–39.
- [24] Beck CR, Collier P, Macfarlane C, et al. *LINE-1* retrotransposition activity in human genomes. *Cell* 2010; 141 : 1159–70.
- [25] Pennisi E. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science* 2012; 337 : 1160–1.
- [26] Ohno S. Evolution by gene duplication. Berlin-Heidelberg-New York : Springer Verlag; 1970.
- [27] Lundin LG. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosome regions in man and the house mouse. *Genomics* 1993; 16 : 1–19.
- [28] Canestro C, Albalat R, Irimia M, et al. Impact of gene gains, losses and duplication modes on the origin and diversification of vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 2013; 24 : 83–94.
- [29] Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002; 18(2) : 74–82.
- [30] Koszul R, Fischer G. A prominent role for segmental duplications in modeling eukaryotic genomes. *C R Biol* 2009; 332 : 254–66.
- [31] Semonce RH, Eichler EE. Segmental duplications and the evolution of the primate genome. *Nature Review Genetics* 2001; 3 : 65–72.
- [32] Marques-Bonet T, Jeffrey M, Kidd JM, et al. A burst of segmental duplications in the genome of the African great ape ancestor. *Nature* 2009; 457 : 877–81.
- [33] Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002; 18(2) : 74–82.
- [34] Zhang F, Gu W, Hurles MA, et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10 : 451–81.
- [35] Redon R, Ishikawa S, Fitch KE, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444 : 444–54.
- [36] The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491 : 56–65.
- [37] Mamtani M, Anaya JM, He W, et al. Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes Immun* 2010; 11 : 155–60.
- [38] Jakobsson J, Ekström L, Inotsume N, et al. Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyltransferase 2B17 polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2) : 687–93.
- [39] Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, et al. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet* 2007; 39 : 1256–60.
- [40] Simmons AD, Carvalho CM, Lupski JR. What have studies of genomic disorders taught us about our genome ? *Methods Mol Biol* 2012; 838 : 1–27.

Structure et fonction du génome humain : particularité des chromosomes sexuels, inactivation du chromosome X

Valérie Malan, Jean-Pierre Siffroi

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	14
Généralités sur les chromosomes sexuels	14
Structure des chromosomes sexuels	14
Inactivation du chromosome X	16
Pathologie des chromosomes sexuels	18

Introduction

Les chromosomes sexuels X et Y sont caractéristiques des mammifères. Ils ont connu une histoire évolutive particulière qui a abouti à un hétéromorphisme marqué et à un chromosome Y qui s'est progressivement éloigné du chromosome X. La monosomie fonctionnelle de l'X qui en a résulté chez les mâles a conduit à la mise en place d'un mécanisme correcteur chez les femelles connu sous le nom d'inactivation du deuxième chromosome X. Les anomalies cytogénétiques des gonosomes soulignent leur rôle majeur dans les fonctions de reproduction.

Généralités sur les chromosomes sexuels

Les chromosomes sexuels, ou gonosomes, sont représentés chez les mammifères par les chromosomes X et Y. Par définition, ces chromosomes sont hétéromorphiques dans le sens où ils ont une taille et un aspect différents, permettant ainsi de distinguer un caryotype mâle (XY) d'un caryotype femelle (XX). Dans l'espèce humaine, le chromosome X est un chromosome métacentrique de taille intermédiaire appartenant au groupe C alors que le chromosome Y est un petit chromosome subtelocentrique du groupe G, au même titre que les chromosomes 21 et 22. Le polymorphisme de taille du chromosome Y humain fait qu'il peut cependant avoir une taille plus importante.

L'existence de gonosomes à côté des autres chromosomes entraîne la formation de deux types de gamètes chez les mâles (sexe hétérogamétique), 23,X et 23,Y alors que les femelles ne produisent que des gamètes 23,X (sexe homogamétique). Une des caractéristiques des gonosomes, et notamment du chromosome Y, est leur spécialisation dans les fonctions de déterminisme gonadique (testicules ou ovaires) et de reproduction, mais il faut savoir qu'il existe d'autres systèmes de déterminisme chromosomique du sexe dans la nature, comme les chromosomes Z et W chez les oiseaux où ce sont les femelles qui sont hétérogamétiques.

L'hétéromorphisme des gonosomes entraîne un comportement particulier de leur part lors de la méiose masculine puisqu'ils ne peuvent pas s'apparier normalement comme le font les deux chromosomes X pendant la méiose féminine. L'asynapsis qui en résulte devrait normalement conduire à la mort des cellules méiotiques et à une infertilité ou encore à des erreurs de ségrégation chromosomique importantes, mais la méiose masculine arrive quand même à se dérouler grâce à l'inactivation des deux gonosomes au sein d'une

structure particulière appelée le corpuscule XY, autrefois vésicule sexuelle, bien visible au stade pachytène [1]. Ce processus d'inactivation transitoire dénommé MSCI (pour *meiotic sex chromosome inactivation*) se prolonge au-delà de la méiose, notamment pour le chromosome X qui comporte beaucoup plus de gènes. La répression de ce dernier pendant la phase post-méiotique touche principalement les gènes en copie unique, ceux en multiples copies revenant à une expression normale peu de temps après la méiose [2].

Structure des chromosomes sexuels

Origine et évolution des gonosomes

Les chromosomes X et Y dérivent d'une paire d'autosomes ancestraux ordinaires mais porteurs d'un locus impliqué dans le déterminisme du sexe. Ces chromosomes ont commencé à diverger l'un de l'autre il y a 250 à 300 millions d'années, la séparation progressive ayant pu se faire en raison de la survenue de quatre inversions sur le futur chromosome Y, chacune d'entre elles supprimant les possibilités de recombinaisons méiotiques dans le segment inversé [3, 4]. En effet, en cas d'inversion, la nécessaire formation d'une boucle à la méiose pour permettre l'appariement des deux chromosomes homologues fait que si une recombinaison survient dans cette boucle, il y a constitution d'un chromosome anormal qui sera éliminé par la sélection naturelle s'il est transmis à la descendance. Comme les inversions chromosomiques sont des accidents interstitiels, elles ont progressivement repoussé vers les extrémités les régions strictement homologues. De plus, en supprimant les possibilités de recombinaisons entre les futurs chromosomes X et Y, ces inversions ont également isolé le chromosome Y sur le plan évolutif alors que le chromosome X a pu continuer à brasser les gènes qu'il contenait et à s'autoréparer à travers les individus femelles XX.

Le chromosome Y s'est donc mis à évoluer pour son propre compte depuis 200 millions d'années, évolution qui l'a conduit à modifier considérablement sa structure par rapport à l'autosome dont il était issu et à ne conserver que 3 % des gènes ancestraux contre 98 % pour le chromosome X [5]. Cette perte massive de gènes a été interprétée comme un signe de la dégénération progressive et continue du chromosome Y, annonçant par là même sa disparition prochaine. Il n'en est rien et les données actuelles de séquençage montrent que la perte de gènes a eu lieu dans les premiers stades de l'évolution du chromosome Y et qu'elle a atteint ensuite un plancher stable [6]. Cette évolution a même été ponctuée de différences très notables entre espèces relativement proches [7–9].

Structure des chromosomes X et Y humains

Les deux gonosomes humains sont bornés, à chaque extrémité télomérique, par des régions d'homologie stricte dénommées « régions pseudo-autosomales » ou PAR (*pseudo-autosomal regions*). La région PAR1, d'une taille de 2,7 Mb, est située à l'extrémité de leur bras court et est due aux inversions survenues sur le chromosome Y qui ont repoussé la partie commune d'origine autosomale ancestrale vers le télomère. La région PAR2, beaucoup plus petite (330 Kb), est située à l'extrémité des bras longs et est d'apparition plus récente puisque provenant de la duplication de matériel de l'X vers l'Y survenue après la séparation humains-chimpanzés [10]. Lors de la méiose, à l'intérieur du corpuscule XY, il existe un appariement possible au niveau de ces régions, notamment dans la région PAR1 où ont lieu des recombinaisons méiotiques.

Particularités du chromosome X

La séquence du chromosome X a été publiée en 2005 [11]. Elle a mis en évidence que ce chromosome, tout en ayant gardé la grande majorité de ses gènes ancestraux, avait une histoire évolutive également complexe. Le chromosome X des mammifères comprend en effet une partie conservée, dénommé XCR (*X-conserved region*) correspondant à son bras long, qui est aussi située sur le chromosome X des marsupiaux mais qui est autosomale chez les monotrèmes. Elle est donc le témoin des premiers stades de l'évolution des gonosomes et notamment de la paire d'autosomes ancestrale dont ils sont issus. Après la séparation avec les marsupiaux il y a 150 millions d'années, la région pseudo-autosomale initiale a fusionné avec un segment d'autosome pour donner la partie XAR (*X-added region*) et son homologue YAR sur l'Y. Chez l'homme ne persiste que la région XAR sur l'X, où elle constitue une bonne partie du bras court alors que la région YAR s'est totalement fragmentée et a disparu en grande partie.

Le chromosome X humain contient un peu plus de 1 000 gènes, ce qui est peu eu égard à sa taille. Cette relative pauvreté en gènes se manifeste à l'opposé par une densité accrue en séquences répétées (56 % de la partie euchromatique vs 45 % en moyenne pour les autosomes). Parmi celles-ci, les éléments *LINE* (*long interspersed nuclear elements*) représentent 29 % de la séquence du chromosome X contre 17 % en moyenne dans le reste du génome [11]. Parmi les gènes présents, environ 10 % (99) ont une expression fréquemment exacerbée dans certains types de cancer alors que leur expression dans les tissus normaux est limitée au testicule. Ces gènes du groupe CT (*cancer-testis*)

sont surreprésentés sur le chromosome X par rapport aux autosomes, ce qui traduit le fait qu'ils constituent plus un avantage pour les mâles que pour les femelles.

Les différences très importantes de taille et de contenu en gènes des gonosomes chez les mammifères font que beaucoup de gènes sur le chromosome X se retrouvent en simple copie chez les mâles et en double copie chez les femelles et que les gènes sur l'X chez les mâles ont un niveau d'expression *a priori* deux fois moindre que celui des gènes autosomiques. Des mécanismes de compensation génique ont donc été mis en place concernant d'une part la surexpression de certains gènes sensibles au dosage, par augmentation de leur transcription ou de la durée de vie de leurs ARNm, de façon à les mettre sur le même niveau que les gènes autosomiques et, d'autre part, l'inactivation quasi complète et aléatoire d'un des deux chromosomes X chez les femelles de façon à rétablir l'équilibre avec les mâles [12]. Cinquante-quatre des gènes présents sur l'X ont cependant un homologue fonctionnel sur l'Y dont 29 sont retrouvés dans les régions PAR (24 dans PAR1 et 5 dans PAR2). Ces gènes, présents en deux exemplaires dans les deux sexes, ont un niveau d'expression égal et échappent donc au mécanisme d'inactivation de l'X chez les femelles.

Particularités du chromosome Y

Spécialisés dans les fonctions de déterminisme du sexe et de reproduction mâle, les chromosomes Y des mammifères qui ont été séquencés présentent des différences interspécifiques très importantes : ainsi, le chromosome Y de souris est-il beaucoup plus long, plus euchromatique et plus riche en séquences amplifiées que ceux décrits jusqu'alors [9]. Chez l'homme, la partie du chromosome Y comprise entre les deux régions PAR était appelée autrefois *non-recombining Y chromosome* (NRY) car non recombinante avec le chromosome X pendant la méiose. Les données du séquençage de ce chromosome, terminé en 2003, ont révélé son aptitude à recombiner avec lui-même et la région NRY est dorénavant appelée *male-specific Y-chromosome* (MSY) [13].

La région MSY humaine est constituée de blocs d'ADN appartenant à des catégories bien définies (figure 2.1) :

- la première est une vaste zone d'hétérochromatine (DYZ1, Z2 et Z18), d'une taille d'environ 40 Mb mais en fait extrêmement variable, située à la partie distale du bras long, avant PAR2;
- la deuxième correspond à la présence sur le bras court d'une région dénommée X-transposée ou XTR (pour *X-transposed region*) d'une taille de 3,4 Mb mais ne contenant que deux gènes. Cette région provient de l'insertion d'un fragment de bras long de chromosome X (Xq21.3) survenu il y a environ 5 millions d'années, c'est-à-dire après que la lignée humaine se

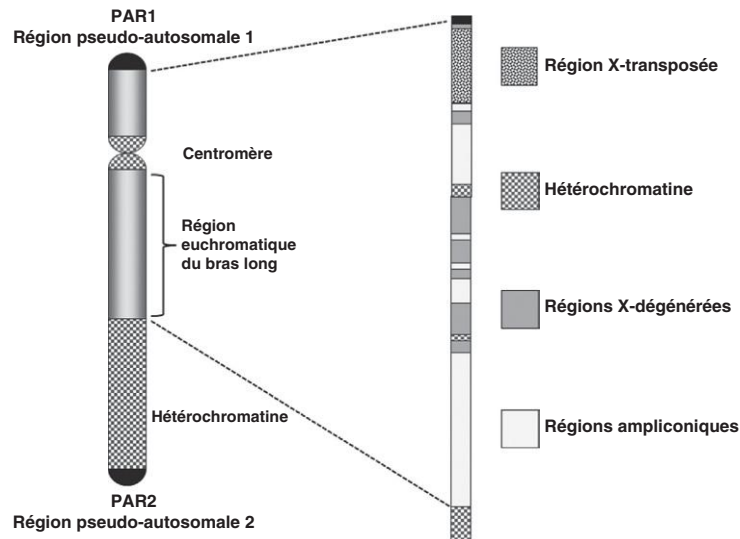


Figure 2.1

Structure du chromosome Y humain.

Chez l'homme, le chromosome Y est composé de quatre grandes familles d'ADN : l'hétérochromatine (centromère, région hétérochromatique distale du bras long, séquences interstitielles), la région X transposée spécifique de l'espèce humaine, les régions X dégénérées traduisant l'origine commune des gonosomes puis leur divergence au cours de l'évolution et enfin les régions ampliconiques riches en gènes exprimés dans le testicule.

soit séparée de celle des chimpanzés. Cette zone n'existe en effet pas sur le chromosome Y de cette espèce;

- la troisième catégorie, dénommée X-dégénérée, est constituée de fragments totalisant une taille de 8,6 Mb répartis tout au long du chromosome Y, sur le bras court comme sur le bras long. Riche de 16 gènes en copie unique, le plus souvent impliqués dans des fonctions de ménage et possédant un homologue sur le chromosome X, elle est le témoin de l'origine commune des deux gonosomes et de l'évolution divergente de l'Y;
- la dernière classe de séquence, très spécifique de l'Y, est dite « ampliconique », car constituée de blocs d'ADN de tailles variables répétés le long du chromosome avec une très grande similitude. Ces amplicons, d'une taille totale de 10,2 Mb, renferment une soixantaine de gènes, appartenant à 9 familles différentes, qui ont tous une fonction mâle-spécifique et sont exprimés préférentiellement ou exclusivement dans le testicule. La caractéristique des amplicons situés sur le bras long est d'être organisés en palindromes dont il existe 8 exemplaires chez l'homme, de longueurs très variables.

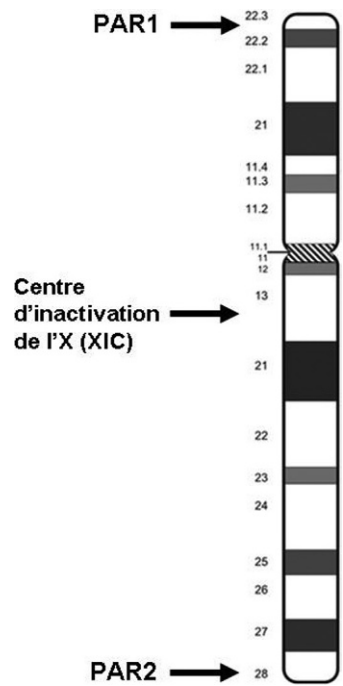
Ainsi, le chromosome Y, malgré sa taille modeste, est particulièrement complexe quant à sa structure et sa composition interne. Il s'agit d'un chromosome évoluant rapidement : outre la région XTR, le chromosome Y humain se distingue de celui de notre plus proche cousin, le chimpanzé, et encore plus de celui du macaque, par plus d'hétérochromatine mais aussi deux fois plus de gènes ou de familles de gènes [6].

Inactivation du chromosome X

Chez plusieurs espèces, dont l'espèce humaine, la paire de gonosomes X et Y permet la détermination sexuelle. Ainsi, le mâle est hétérogamétique XY alors que la femelle est homogamétique XX et le caractère mâle est déterminé par le chromosome Y comme cela a été vu précédemment.

L'inactivation de l'X : un exemple éloquent de régulation épigénétique

Chez les mammifères, afin d'assurer un niveau égal d'expression des gènes de l'X entre le mâle et la femelle, il existe un processus d'inactivation d'un chromosome X qui fait intervenir un locus situé en Xq13 chez l'homme (e-figure 2.2). Ce locus XIC (*X-inactivation center* ou centre d'inactivation de l'X) correspond à une région contenant les séquences nécessaires et suffisantes pour induire l'inactivation d'un chromosome X. Cette région a pu être identifiée chez l'homme et la souris grâce à des translocations X-autosomes [14, 15]. Il a pu également être démontré que deux locus XIC étaient nécessaires pour que le phénomène d'inactivation de l'X se produise. En effet, cette étape de comptage qui correspond au dénombrement des locus XIC dans la cellule est essentielle car un seul chromosome X va rester actif par set diploïde d'autosomes [16]. Ainsi, dans les situations de polygonosomies telle que les femmes 47,XXX, deux chromosomes X seront inactivés dans les cellules.



e-figure 2.2

La région XIC est localisée en Xq13.

Ce locus XIC, dont la taille est d'environ 1 Mb, comprend de nombreux ARN non codants dont le gène *Xist* (pour *X-inactive-specific-transcript*) qui est présent uniquement chez les eutheriens. À un stade précoce du développement embryonnaire, le phénomène d'inactivation de l'X est initié par ce gène *Xist* qui génère un long ARN non codant, d'une taille de 19 kb chez l'homme. Ce transcrit déclenche le silence transcriptionnel des gènes de l'X en *cis* en recouvrant le futur chromosome X inactif [17]. Il induit par la suite de nombreux changements chromatinien, comme la modification des histones et la méthylation de l'ADN, ce qui permet une extinction stable des gènes de l'X au cours des divisions cellulaires. Ainsi, l'un des deux chromosomes X chez la femelle passe d'un état actif à un état inactif donc hétérochromatique. Chez les mammifères eutheriens, cette inactivation se fait au hasard dans les cellules somatiques. Ainsi, les femelles XX sont mosaïques avec deux populations cellulaires selon que le chromosome X d'origine maternelle ou paternelle est inactivé [18]. À l'inverse, chez les marsupiaux, l'expression du gène *Xist* est soumise à empreinte et c'est le chromosome X paternel qui est inactivé dans tous les tissus.

Chez les mammifères eutheriens, il est à souligner que l'inactivation transcriptionnelle ne concerne pas tous les gènes de l'X. En effet, il a été démontré chez l'homme qu'environ 15 % des gènes avaient une expression biallélique et échappaient donc au processus d'inactivation de l'X [19–21]. La plupart d'entre eux se situent dans les régions pseudo-autosomiques PAR1 et PAR2 (localisées aux extrémités télomériques) et ont leur homologue sur le chromosome Y. Le niveau d'expression de ces gènes est donc égal entre les deux sexes [22]. Il existe aussi des gènes échappant à l'inactivation de l'X localisés en dehors des régions PAR1 et PAR2 et qui correspondent probablement à des vestiges des protochromosomes sexuels. Enfin, certains gènes ont une expression à partir des deux chromosomes X mais sans avoir leur homologue sur le chromosome Y. D'autre part, Carrel *et al.* ont démontré qu'environ 10 % des gènes de l'X avaient un profil d'expression variable selon les femmes [19]. Ces gènes se situent principalement sur le bras court du chromosome X, dans une région correspondant à la cinquième strate de l'évolution, c'est dire la plus récente. De plus, parmi les gènes échappant à l'inactivation, le niveau d'expression peut être variable puisque certains atteignent seulement 25 % de leur expression complète. Enfin, il est à noter qu'il existe aussi une spécificité tissulaire des gènes échappant à l'inactivation de l'X [23].

Mise en évidence du chromosome X inactif

Visualisation du chromosome X inactif : le corpuscule de Barr

Les premières observations cytogénétiques chez l'homme ont montré que le chromosome X inactif était visible dans le noyau interphasique sous la forme d'un petit corpuscule chromatinien appelé corpuscule de Barr ou chromatine sexuelle [24]. Ainsi, le nombre de corpuscules chromatinien est égal à $X - 1$. En cas de dysgonosomies (45,X, 47,XXX...), le diagnostic peut être donc établi par le comptage des corpuscules de Barr à partir d'un simple frottis buccal.

Mise en évidence du chromosome Xi par la technique cytogénétique

Cette technique cytogénétique est basée sur le fait que le chromosome X inactif se réplique tardivement au cours des divisions cellulaires. Ainsi, lors de la réalisation du caryotype, il est possible de distinguer les régions chromosomiques à réplication précoce des régions à réplication tardives grâce à l'ajout de Brdu (5-bromo-2'-deoxyuridine) qui est un analogue de la thymidine. Si l'addition de Brdu est effectuée en fin de phase S du cycle cellulaire, il sera incorporé uniquement par le chromosome X inactif et celui-ci aura un aspect clair sur la préparation chromosomique après un traitement aux ultraviolets. Cette technique est intéressante en routine si l'un des chromosomes X présente une anomalie de structure permettant de le repérer sur les métaphases (e-figure 2.3). 

Mise en évidence du chromosome Xi par les techniques de biologie moléculaire

Par des techniques de biologie moléculaire, il est possible de distinguer les deux types de populations cellulaires en fonction du chromosome X qui a été inactivé. Une des techniques utilisée en diagnostic cible le locus du gène du récepteur des androgènes. La région en 5' de ce gène est méthylée sur le chromosome X inactif (Xi) et non méthylée sur le chromosome X actif (Xa). Une enzyme de restriction sensible à la méthylation (HpaII) est utilisée afin de cliver les séquences non méthylées présentes sur le chromosome Xa. Puis, par une étape de PCR, seul l'allèle présent sur le chromosome Xi est amplifié car il sera resté intact après la digestion enzymatique. Un polymorphisme de répétition (CAG) situé dans l'exon 1 du gène permet de distinguer les chromosomes X d'origine paternelle et maternelle. Si l'inactivation s'est produite au hasard dans l'échantillon testé, les



e-figure 2.3

Caryogramme partiel des chromosomes 1 et X en Brdu.

Notez que le chromosome X à droite correspondant au dérivé X d'une translocation 1; X est inactivé.

deux populations cellulaires (avec l'X paternel inactif et X maternel inactif) seront présentes en quantité équivalente. Le séquenceur permet d'obtenir un pic pour chaque allèle, pics qui seront donc de même hauteur dans cette situation. En effet, la mesure relative des deux pics donne une estimation de la proportion de cellules ayant l'un ou l'autre X actif.

Anomalies de structure du chromosome X

Les anomalies de structure du chromosome X sont à l'origine de deux types de conséquences :

- le biais d'inactivation de l'X;
- la disomie fonctionnelle de l'X.

Le biais d'inactivation de l'X

Le biais d'inactivation de l'X correspond à une inactivation préférentielle d'un chromosome X, qu'il soit paternel ou maternel, dans plus de 80 % des cellules. Les causes sont variées : le hasard, l'âge, une mutation de *Xist* et les causes géniques ou chromosomiques. Plus particulièrement, les anomalies de structure de l'X équilibrées ou déséquilibrées sont le plus souvent à l'origine d'un biais d'inactivation de l'X. Par exemple, en cas de délétion de l'X ou isochromosome de l'X, un désavantage sélectif se produit envers les cellules qui auront inactivé l'X normal. Il s'agit d'une sélection secondaire qui survient après l'étape d'inactivation aléatoire d'un chromosome X dans la cellule. Concernant les translocations X/autosomes équilibrées qui n'impliquent pas le locus XIC, c'est le chromosome X normal qui sera inactivé permettant d'assurer un niveau égal d'expression des gènes de l'X, évitant ainsi une disomie fonctionnelle de la partie du chromosome X transloqué sur l'autosome.

La disomie fonctionnelle de l'X

Comme nous l'avons vu précédemment, un seul allèle est fonctionnel pour la grande majorité des gènes de l'X. Cependant, il existe des situations pathologiques qui sont à l'origine d'une expression excessive des gènes de l'X dont l'expression est normalement mono-allélique. C'est ce que l'on appelle la disomie fonctionnelle. Le phénotype associé est habituellement très sévère comme le cas de la microduplication Xq28 [25, 26]. Chez le garçon, toute duplication de l'X entraîne obligatoirement une disomie fonctionnelle. Chez les filles, la disomie fonctionnelle porte sur des segments de l'X séparés du centre d'inactivation de l'X du fait d'un remaniement de structure.

Pathologie des chromosomes sexuels

La pathologie chromosomique liée aux gonosomes diffère radicalement de celle impliquant les autosomes et ceci pour trois raisons.

La première est le phénomène d'inactivation du chromosome X qui fait que le déséquilibre génique ne va porter que sur les quelques gènes qui échappent à cette inactivation. *A contrario*, la monosomie fonctionnelle de l'X étant la règle, la formule chromosomique 45,X est potentiellement viable et représente la seule monosomie non létale observable en pathologie humaine.

La deuxième, en rapport avec la précédente, concerne l'inactivation préférentielle d'un des deux chromosomes X en cas d'anomalie de structure de l'un d'eux. Ce phénomène, ou biais d'inactivation, peut toucher l'X remanié ou l'X normal selon l'anomalie en cause. Chez un individu XY, toute anomalie de structure du chromosome X entraîne un déséquilibre génique important et rapidement létal.

La troisième raison est l'extrême spécialisation du chromosome Y dans les fonctions de déterminisme du sexe et de reproduction qui fait que l'effet des déséquilibres chromosomiques affectant ce chromosome, qu'ils soient de nombre ou de structure, ne s'exprimera *a priori* que dans la sphère génitale et n'aura que peu ou pas de conséquences sur l'organisme en général.

Anomalies de nombre des gonosomes

Les dysgonosomies sont des accidents chromosomiques fréquents à la conception. Elles peuvent être diagnostiquées en prénatal ou en période néonatale mais peuvent ne se révéler qu'à la puberté voire à l'âge adulte devant des problèmes de fertilité. La description clinique précise de ces syndromes a fait l'objet des très nombreuses revues et dépasse le cadre de ce chapitre. Ne seront abordées que leurs caractéristiques principales.

Syndrome de Turner

La formule chromosomique classique de ce syndrome est la formule 45,X qui fait qu'il est le plus souvent assimilé à la monosomie X. Cependant, il s'agit tout autant, si ce n'est plus, d'une nullosomie Y car le chromosome Y porte une douzaine de gènes à expression dosage-dépendante qui sont essentiels à la survie des embryons XY et qui possèdent un homologue échappant à l'inactivation sur le chromo-

somme X [5]. La conséquence directe est que la très grande majorité (> 99 %) des embryons présentant un caryotype 45,X homogène ne se développent pas et qu'on peut se demander si ceux qui arrivent à terme et donnent des enfants atteints ne sont pas des mosaïques non détectées.

Décrit cliniquement par Henry H. Turner en 1938 [27], le syndrome qui porte son nom restera inexpliqué jusqu'en 1959 quand sera découverte l'anomalie chromosomique qui le caractérise [28]. Affectant environ 1/2 500 nouveau-né de sexe féminin, il peut se présenter à la naissance sous l'aspect d'un syndrome de Bonnevie-Ullrich associant une petite taille, un lymphoedème des mains et des pieds et un excès de peau au niveau de la nuque (*pterygium colli*). Des malformations cardiaques (coarctation de l'aorte) ou rénales (rein en fer à cheval) peuvent être présentes et repérables à l'échographie anténatale, de même que les anomalies au niveau de la nuque (hygroma kystique). Dans l'enfance, ce sont les problèmes de petite taille qui doivent être repérés et pris en charge et, à l'adolescence, une aménorrhée primaire traduira l'existence d'une dysgénésie gonadique pure (*streak gonads*) [29]. Il n'y a pas de déficience intellectuelle dans le syndrome de Turner et seules ont pu être décrites des particularités psychologiques particulières. Chez la femme adulte, des grossesses sont néanmoins possibles après don d'ovocytes mais doivent faire l'objet d'une surveillance cardio-vasculaire très rapprochée [30].

Au point de vue chromosomique, outre la formule chromosomique classique 45,X, le syndrome de Turner se caractérise par la fréquence des mosaïques dont la plus courante est de type 45,X/46,XX. Les mosaïques 45,X/46,XY existent également, avec un faible contingent de cellules Y positives, ce qui explique le développement phénotypique féminin. Elles doivent être recherchées systématiquement, par FISH ou par PCR, devant une formule 45,X apparemment homogène dans le sang car elles sont un facteur de mauvais pronostic pour le risque de transformation maligne des gonades dysgénésiques. Elles imposent donc une proposition de gonadectomie. À côté des anomalies de nombre, le syndrome de Turner peut être dû à l'existence d'une anomalie de structure d'un des chromosomes X comme un isochromosome X pour le bras long [46,X,i(Xq)] ou encore un anneau de l'X [46,X,r(X)] si la taille de ce dernier lui a fait perdre suffisamment de gènes. Il existe en effet des femmes porteuses d'un très grand anneau de l'X qui sont phénotypiquement normales et même fertiles. Une mention particulière doit être apportée concernant les anneaux de très petite taille qui ont perdu le locus *Xist* et ne peuvent donc plus s'inactiver. Ce sont eux qui donnent les rares cas de syndrome de Turner avec déficience intellectuelle et ils peuvent poser de difficiles interprétations en prénatal.

Syndrome de Klinefelter

Le syndrome de Klinefelter fut décrit cliniquement en 1942 par Harry F. Klinefelter à partir de neuf sujets présentant une gynécomastie bilatérale, des petits testicules, une aspermatogénèse avec fonction leydigienne normale ou peu diminuée et une FSH (pour *follicle-stimulating hormone*, hormone folliculo-stimulante) augmentée [31]. La formule chromosomique 47,XXY qui le caractérise sera la deuxième anomalie chromosomique humaine publiée, quelques jours après la trisomie 21 [32].

La prévalence du syndrome de Klinefelter dans la population générale est difficile à déterminer avec précision puisqu'environ deux tiers des sujets atteints ne sont jamais diagnostiqués [33]. Des études déjà anciennes réalisées sur des nombres importants de nouveau-nés non sélectionnés donnent une prévalence du syndrome comprise entre 1/700 et 1/1 000 garçons à la naissance [34–36].

Le diagnostic de syndrome de Klinefelter n'est pratiquement jamais porté à la naissance, sauf en cas de diagnostic prénatal fortuit fait pour une tout autre raison. Il faut donc attendre la puberté et l'âge adulte pour trouver des signes cliniques susceptibles d'aboutir à la réalisation d'un caryotype mais la variabilité interindividuelle de ces signes fait que le diagnostic peut être porté plus ou moins tôt. Ce qui caractérise les sujets Klinefelter de façon quasi constante est l'atteinte testiculaire, avec ou sans signe d'hypogonadisme, et surtout le petit volume testiculaire [33]. La cause principale de découverte de ce syndrome reste donc l'infertilité due à une azoospermie et cette anomalie chromosomique est diagnostiquée chez environ 3 % des hommes infertiles non sélectionnés mais chez plus de 10 % de ceux qui présentent une azoospermie sécrétoire [37].

Le syndrome de Klinefelter se caractérise par la fréquence des mosaïques qui, dans ce dernier cas, peuvent atteindre 20 % avec, comme anomalie la plus souvent rencontrée, une formule chromosomique de type 47,XXY/46,XY [38]. L'atteinte testiculaire dépend alors du pourcentage de cellules XXY et de leur localisation, notamment au niveau des gonades. Le diagnostic de ces mosaïques est d'une particulière importance car il conditionne en partie les chances de succès des biopsies testiculaires qui peuvent être proposées aux hommes Klinefelter. Il est maintenant en effet acquis que ces hommes, lorsqu'ils arrivent à produire quelques spermatozoïdes, le font à partir de cellules-souches normales XY et que, même s'ils sont XXY de façon homogène dans le sang, ce sont en fait des mosaïques au moins au niveau testiculaire [39].

Autres aneuploïdies gonosomiques : trisomie X et double Y

La formule chromosomique 47,XXX fut décrite également en 1959 chez une femme de 35 ans visiblement atteinte d'insuffisance ovarienne primitive malgré le terme de « super-femme » qui fut utilisé [40]. La fréquence de cette anomalie dans la population est, comme pour le syndrome de Klinefelter, difficile à évaluer car la majorité des femmes porteuses n'est pas diagnostiquée mais elle doit se situer autour de 1/1 000 femmes. D'une taille souvent au-dessus de la moyenne en raison de l'existence de trois copies du gène *SHOX* situé dans la région PAR1 échappant dans son ensemble à l'inactivation, ces femmes ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières. Leur fertilité est normale mais elles ont un risque augmenté de développer une insuffisance ovarienne primitive, comme dans le cas princeps. Leur descendance est également normale sur le plan chromosomique. En fait, les seules questions tournent autour de leur développement psychomoteur qui semble un peu retardé et sujet à divers troubles psychiatriques. Leur QI semble diminué de 20 points bien qu'on ne puisse pas parler de déficience intellectuelle dans ce syndrome [41]. Ces données sont cependant à prendre avec une extrême précaution en raison du caractère biaisé de la plupart des études faites sur des sujets symptomatiques.

La constitution chromosomique 47,XYY, ou « double Y », fut décrite en 1961 [42]. Sa fréquence est également estimée à 1/1 000 hommes bien que la plupart d'entre eux ne soient jamais diagnostiqués. D'une taille supérieure à la moyenne, toujours en raison de la présence de trois copies du gène *SHOX* mais également des gènes portés par l'Y et impliqués dans la différence de taille entre les hommes et les femmes, les hommes XYY ne présentent pas de morphotype particulier et leur fertilité est le plus souvent normale. La fréquence de ce syndrome est cependant augmentée dans la population des hommes infertiles [43]. Les études en FISH faites sur les spermatozoïdes d'hommes XYY ne montrent pas d'élévation du taux d'aneuploïdie touchant les gonosomes, ce qui indique que le chromosome Y surnuméraire est probablement perdu à la méiose [44]. Le problème majeur concernant les sujets XYY concerne surtout leur développement psychomoteur. En dehors des problèmes de fertilité, ceux qui sont diagnostiqués à l'âge adulte le sont souvent pour des troubles du comportement et des troubles du spectre autistique [45].

Anomalies de structure des gonosomes

Les anomalies de structure des chromosomes sexuels sont nombreuses et peuvent s'accompagner d'un phénotype normal, même en cas d'anomalie déséquilibrée, en raison de l'existence d'un biais d'inactivation. Certaines d'entre elles entraînent un phénotype turnérien par la perte de segments entiers de l'X qu'elles causent mais aussi par leur éventuelle instabilité mitotique, notamment pour certains isochromosomes ou pour les anneaux, qui aboutit invariablement à la constitution d'une population cellulaire 45,X plus ou moins importante. D'autres sont spécifiquement associées à des troubles de la fonction gonadique.

Anomalies de structure du chromosome X et insuffisance ovarienne primitive

L'insuffisance ovarienne primitive (IOP) se définit comme une aménorrhée primaire ou secondaire de plus de quatre mois avec un taux de FSH > 20 m UI/mL survenant avant l'âge de quarante ans. C'est une pathologie fréquente touchant entre 2 % et 3 % des femmes. Conséquence de la dysgénésie gonadique dans le syndrome de Turner, l'IOP peut également être due à la monosomie de régions particulières du chromosome X, notamment du bras long où deux régions critiques ont été définies, en Xq26-27 et en Xq13-q21 [46, 47]. Des délétions de la partie proximale du bras court (Xp11.2) sont aussi associées à une IOP chez des patientes présentant certains signes de syndrome de Turner mais potentiellement fertiles [48]. Enfin, les translocations X-autosomes sont également classiquement associées à la survenue d'une IOP. La plupart des points de cassure chromosomique sur l'X se situent dans la région critique Xq13-q21 mais ne semblent pas interrompre de gènes importants pour le fonctionnement ovarien [49]. Le mode d'action passerait alors soit par un effet de position, soit par l'interruption d'un gène autosomique, soit encore par des perturbations méiotiques liées à des défauts d'appariement.

Délétions du bras long du chromosome Y et infertilité masculine

L'existence de facteurs contrôlant la spermatogenèse localisés dans la partie euchromatique du bras long du chromosome Y fut établie dès 1976 à partir de six hommes azoospermiques porteurs de ce qu'on appelait alors des chromosomes Y non fluorescents, c'est-à-dire des Y ayant

perdu la zone hétérochromatique distale du bras long et une partie de la région euchromatique [50]. Ces facteurs portèrent ensuite le nom générique de facteurs AZF (pour *azoospermia factor*). D'autres anomalies de structure du chromosome Y furent ensuite associées à l'existence d'une infertilité masculine, confortant ainsi l'existence des facteurs AZF au niveau du bras long (figure 2.4).

Une fois les techniques moléculaires disponibles pour baliser cette région, de grandes séries de patients infertiles furent étudiées et il fut établi qu'environ 10 % des hommes présentant une azoospermie non obstructive ou sécrétoire, ou bien une oligozoospermie extrême, toutes de nature idiopathique, étaient porteurs de microdélétions interstitielles de la région AZF [51]. Le caractère récurrent et non chevauchant, ou partiellement chevauchant, de ces microdélétions amena à distinguer trois locus dénommés AZFa, assez proximal en Yq11.22, AZFb et AZFc en Yq11.23, très proches de la zone hétérochromatique [52].

L'origine de ces microdélétions réside dans la structure même du chromosome Y humain, riche en séquences répétées qui prédisposent à des recombinaisons homologues non alléliques. Ainsi, les microdélétions AZFa sont-elles dues à des recombinaisons entre des séquences rétrovirales flanquantes alors que celles touchant AZFb ou AZFc sont la conséquence de recombinaisons entre bras palindromiques. Ces dernières sont beaucoup plus fréquentes que les autres en raison de la taille des régions homologues entre lesquelles les recombinaisons peuvent survenir.

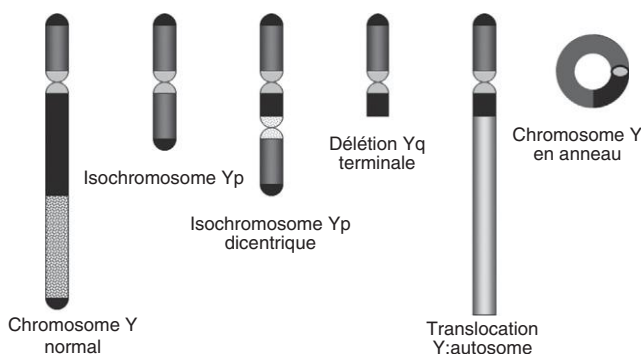


Figure 2.4

Exemples d'anomalies de structure du chromosome Y associées à une infertilité.

La caractéristique commune de ces anomalies est la perte totale ou partielle de la partie euchromatique du bras long au niveau de laquelle se situe la région AZF.

La gravité des phénotypes testiculaires observés est également variable. Les microdélétions AZFa sont synonymes d'absence de cellules germinales, ou SCO (pour *Sertoli cell-only syndrome*) alors que les délétions AZFb s'accompagnent d'un blocage des cellules en méiose. Dans les deux cas, les hommes porteurs sont azoospermiques et une biopsie testiculaire en vue de faire une fécondation *in vitro* est inutile chez eux. Par contre, dans les microdélétions AZFc, on retrouve assez souvent des spermatozoïdes utilisables en fécondation *in vitro* (FIV) mais les couples doivent être alors informés que tous les garçons qu'ils pourront avoir par cette technique seront porteurs de la même microdélétion de l'Y que leur père [53].

Translocations X-Y : femmes XY et hommes XX

Des discordances entre le sexe génétique d'un individu et son sexe phénotypique peuvent être observées, avec ou sans malformations génitales associées. Le diagnostic peut donc être fait en prénatal ou à la naissance mais également à la puberté, voire à l'âge adulte, ce qui pose de difficiles problèmes d'annonce et de gestion du diagnostic.

En raison des séquences plus ou moins homologues persistant entre les deux chromosomes sexuels, des erreurs de recombinaisons méiotiques pendant la spermatogenèse peuvent survenir. Le *crossing-over* obligatoire qui a lieu dans la région PAR1 des deux gonosomes se fait alors de façon inégale et une partie du bras court de l'Y passe sur l'X. Le résultat net est que le gène SRY, qui initie le déterminisme testiculaire, n'est plus porté par l'Y mais par l'X [54]. En cas de fécondation par le gamète où a eu lieu cet accident méiotique, on aura donc d'un côté un individu XY, SRY négatif avec un phénotype féminin et une dysgénésie gonadique, et de l'autre un individu XX, SRY positif, c'est-à-dire un homme avec un testicule normalement formé mais incapable de produire des spermatozoïdes à cause de l'absence de toutes les régions AZF du bras long. Contrairement aux femmes XY par insensibilité complète aux androgènes, qui présentent des testicules intra-abdominaux ayant sécrété de l'hormone antimüllérienne (AMH, pour *anti-müllerian hormone*) pendant la vie fœtale et qui n'ont donc plus d'utérus, celles possédant un chromosome Y ayant perdu le gène SRY ont gardé leur tractus génital féminin et peuvent donc avoir des grossesses après don d'ovocytes.

ENTRAÎNEMENT 2 QCM

QCM 1

Les chromosomes sexuels des mammifères :

- A. Sont hétéromorphiques
- B. Ont évolué à partir d'une paire d'autosomes
- C. Font que les femelles sont hétérogamétiques
- D. Ne s'apparient pas à la méiose
- E. Sont riches en séquences répétées

QCM 2

Le chromosome Y humain :

- A. Présente un fragment transposé du chromosome X
- B. Est identique à celui du chimpanzé
- C. Présente une région hétérochromatique distale sur le bras long
- D. Est surtout composé d'une région dite MSY
- E. Contient des gènes ayant un homologue sur le chromosome X

QCM 3

L'inactivation du chromosome X est :

- A. Un phénomène épigénétique
- B. Se produit dès la fécondation
- C. Est soumise à empreinte chez l'homme
- D. Se produit dans toutes les cellules de l'organisme
- E. Est généralement biaisée chez les femmes porteuses d'une anomalie génétique sur un de leur chromosome X

QCM 4

La disomie fonctionnelle du chromosome X :

- A. Est généralement observée chez les garçons mais pas chez les filles
- B. Correspond à une expression excessive d'une partie des gènes du chromosome X
- C. Est à l'origine d'un phénotype sévère avec déficience intellectuelle chez les garçons
- D. Est observée chez une fille porteuse d'un anneau du chromosome X sans le gène *Xist*
- E. Est plus souvent observée chez les filles que chez les garçons

QCM 5

Le syndrome de Turner :

- A. Correspond à la nullosomie de gènes portés par le chromosome Y
- B. Peut se manifester à la naissance par un syndrome de Bonnevie-Ullrich
- C. Se caractérise par une déficience intellectuelle

- D. Se caractérise par une taille supérieure à la moyenne
- E. Peut être dû à des anomalies de structure du chromosome X

QCM 6

Le syndrome de Klinefelter est caractérisé par :

- A. Une déficience intellectuelle constante
- B. La fréquence des mosaïques
- C. Une infertilité
- D. L'existence d'un chromosome X surnuméraire
- E. Des malformations viscérales fréquentes

QCM 7

Le bras long du chromosome X :

- A. Échappe à l'inactivation
- B. Contient le locus *Xist*
- C. Peut être présent en trois exemplaires dans le syndrome de Turner
- D. Correspond à la région XCR (*X-conserved region*)
- E. Contient des régions impliquées dans l'insuffisance ovarienne primitive

QCM 8

Chez une femme avec une formule chromosomique XY, SRY négative :

- A. On observe une dysgénésie gonadique
- B. Une fertilité est possible
- C. Les frères ont tous une formule chromosomique XX
- D. Le chromosome X est d'origine paternelle
- E. Une recombinaison génétique anormale a eu lieu pendant la méiose paternelle

QCM 9

Le facteur AZF :

- A. Est localisé sur le bras court du chromosome Y
- B. Se subdivise en trois locus
- C. A été mis en évidence grâce à des délétions chromosomiques
- D. Est impliqué dans le déterminisme testiculaire
- E. Est perdu lors de la formation d'un isochromosome Yp

QCM 10

Les microdélétions du chromosome Y :

- A. Touchent 10 % des hommes présentant une azoospermie sécrétoire
- B. Peuvent être interstitielles
- C. Entraînent toujours un syndrome des cellules de Sertoli seules
- D. Sont le plus souvent des délétions AZFc
- E. Peuvent être transmises à la descendance

Références

- [1] Turner JMA. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 2007; 134 : 1823–31.
- [2] Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, et al. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet* 2008; 40 : 794–9.
- [3] Ellegren H. Sex chromosome evolution : recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat Rev Genet* 2001; 12 : 157–66.
- [4] Lahn BT, Page DC. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 1999; 286 : 964–7.
- [5] Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, et al. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 2014; 508 : 494–9.
- [6] Bachtrog D. Y chromosome evolution : emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat Rev Genet* 2013; 14 : 113–24.
- [7] Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, et al. Conservation of Y-linked genes during human evolution revealed by comparative sequencing in chimpanzee. *Nature* 2005; 437 : 101–4.
- [8] Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, et al. Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. *Nature* 2015; 483 : 82–6.
- [9] Soh YQ, Alföldi J, Pyntikova T, et al. Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes. *Cell* 2014; 159 : 1–14.
- [10] Freije D, Helms C, Watson MS, et al. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 1992; 258 : 1784–7.
- [11] Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005; 434 : 325–37.
- [12] Deng X, Berletch JB, Nguyen DK, et al. X chromosome regulation : diverse patterns in development, tissues and disease. *Nat Rev Genet* 2014; 15 : 367–78.
- [13] Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423 : 825–37.
- [14] Augui S, Nora EP, Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet* 2011; 12 : 429–42.
- [15] Rastan S. Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos—location of the inactivation centre. *J Embryol Exp Morphol* 1983; 78 : 1–22.
- [16] Chaligne R, Heard E. X-chromosome inactivation in development and cancer. *FEBS Lett* 2014; 588 : 2514–22.
- [17] Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, et al. The human *XIST* gene : analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 1992; 71 : 527–42.
- [18] Chow J, Heard E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21 : 359–66.
- [19] Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005; 434 : 400–4.
- [20] Talebizadeh Z, Simon SD, Butler MG. X chromosome gene expression in human tissues : male and female comparisons. *Genomics* 2006; 88 : 675–81.
- [21] Cotton AM, Ge B, Light N, et al. Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol* 2013; 14(11) : R122.
- [22] Johnston CM, Lovell FL, Leongamornlert DA, et al. Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete. *PLoS Genet* 2008; 4(1).
- [23] Cotton AM, Lam L, Affleck JG, et al. Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Hum Genet* 2011; 130 : 187–201.
- [24] Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurons from the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 1949; 163 : 676–7.
- [25] Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, et al. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 2005; 77 : 442–53.
- [26] Sanlaville D, Prieur M, de Blois MC, et al. Functional disomy of the Xq28 chromosome region. *Eur J Hum Genet* 2005; 13 : 579–85.
- [27] Turner HH. A syndrome with infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology* 1938; 23:566–74.
- [28] Ford CE, Jones KW, Polani PE, et al. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959; 273 : 711–3.
- [29] Cabrol S. Le syndrome de Turner. *Ann Endocrinol* 2007; 68 : 2–9.
- [30] HAS. Syndrome de Turner. Protocole national de diagnostic et de soins. www.has-sante.fr, 2008.
- [31] Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1942; 2 : 615–27.
- [32] Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959; 183 : 302–3.
- [33] Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, et al. Klinefelter's syndrome. *Lancet* 2004; 364 : 273–83.
- [34] Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann Hum Genet* 1974; 37 : 359–68.
- [35] Hamerton JL, Canning N, Ray M, et al. A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. *Clin Genet* 1975; 8 : 223–43.
- [36] Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children : results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet* 1991; 87 : 81–3.
- [37] McLachlan RI, O'Bryan MK. State of the art for genetic testing in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95 : 1013–24.
- [38] Maiburg M, Repping S, Giltay J. The genetic origin of Klinefelter syndrome and its effect on spermatogenesis. *Fertil Steril* 2012; 98 : 254–60.
- [39] Sciarano RB, Luna Hisano CV, Rahn MI, et al. Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. *Hum Reprod* 2009; 24 : 2353–60.
- [40] Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, et al. Evidence for the existence of the human "super female". *Lancet* 1959; 274 : 423–5.
- [41] Otter M, Schrander-Stumpel C, Curfs L. Triple X syndrome : a review of the literature. *Eur J Hum Genet* 2010; 18 : 265–71.
- [42] Sandberg AA, Koepf GF, Ishihara T, et al. An XYY human male. *Lancet* 1961; 278 : 488–9.
- [43] Kim IW, Khadilkar AC, Ko EY, et al. 47, XYY syndrome and male infertility. *Rev Urol* 2013; 15 : 188–96.
- [44] Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa : FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; 121 : 655–66.

- [45] Margari L, Lamanna AL, Craig F, et al. Autism spectrum disorders in XYY syndrome : two new cases and systematic review of the literature. *Eur J Pediatr* 2014; 173 : 277–83.
- [46] Portnoi MF, Aboura A, Tachdjian G, et al. Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in premature ovarian failure patients. *Hum Reprod* 2006; 21 : 2329–34.
- [47] Toniolo D. X-linked premature ovarian failure : a complex disease. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16 : 293–300.
- [48] Lachlan KL, Youings S, Costa T, et al. A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. *Hum Genet* 2006; 118 : 640–51.
- [49] Schlessinger D, Herrera L, Crisponi L, et al. Genes and translocations involved in POF. *Am J Med Genet* 2002; 111 : 328–33.
- [50] Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34 : 119–24.
- [51] Vogt P. Azoospermia factor (AZF) in Yq11 : towards a molecular understanding of its functions for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Bio Med on Line* 2005; 10 : 81–93.
- [52] Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5 : 933–45.
- [53] Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis. *Hum Reprod* 2000; 15 : 1431–4.
- [54] McElreavey K, Cortes LS. X-Y translocations and sex differentiation. *Semin Reprod Med* 2001; 19 : 133–9.

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 2.2

La région XIC est localisée en Xq13.



e-figure 2.3

Caryogramme partiel des chromosomes 1 et X en Brdu.



Structure et fonction du génome humain

Benoît Arveiler

PLAN DU CHAPITRE

Le projet « Génome humain »	26	Éléments régulateurs à distance des séquences transcrites	31
Carte génétique	26	Répertoire des éléments fonctionnels dans le génome humain	31
Carte physique	27	Perspectives	32
Séquençage du génome	28	Polymorphisme du génome humain	33
Projet HapMap	28	Variants d'un nucléotide (SNV, pour <i>single nucleotide variant</i>)	34
Projet 1000 génomes	28	Microsatellites	35
Conclusion	29	Variants de nombre de copies (CNV, pour <i>copy number variation</i>)	35
ADN codant et non codant dans le génome humain	29		
Les gènes codant pour des protéines	29		
Les gènes transcrits en ARN non codants	30		

Le projet « Génome humain »

C'est avec la découverte des premiers polymorphismes de l'ADN, les polymorphismes de longueur de fragments de restriction (*restriction fragment length polymorphisms* : RFLP) [1], en 1980, que la cartographie du génome humain a pu être envisagée et a réellement débuté. Cette découverte a été le point de départ d'une aventure qui a conduit à l'obtention en 2003 de la carte avec le degré de résolution le plus fin possible, la séquence du génome [2]. Le séquençage du génome humain ne signifie pas pour autant que le bout du chemin a été atteint. Il s'agit d'un point d'étape crucial qui permet maintenant de mieux appréhender la diversité du génome, de dresser un répertoire des gènes qu'il contient, de découvrir plus rapidement des gènes impliqués dans des maladies génétiques à hérédité mendélienne ou non mendélienne, d'investiguer le rôle des séquences situées entre les gènes, et d'aller vers une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des gènes à l'échelle du génome.

À l'heure où le séquençage du génome ne prend plus que quelques heures, où la découverte d'un nouveau gène responsable d'une maladie génétique ne prend plus que quelques semaines ou mois, il n'est pas inutile de rappeler le cheminement suivi au cours des quatre dernières décennies. C'est ce que nous allons faire dans ce chapitre.

Le travail de cartographie du génome humain a parfois suivi des chemins parallèles, plusieurs stratégies plus ou moins complémentaires étant mises en œuvre au gré des savoir-faire particuliers et de l'inventivité des chercheurs impliqués. Pour des raisons didactiques, nous avons délibérément choisi de ne décrire que les principales stratégies qui ont été mises en œuvre.

Carte génétique

L'établissement d'une carte génétique nécessite de disposer de polymorphismes au niveau de l'ADN, définis par au moins deux allèles distincts.

Les RFLP sont des changements d'un nucléotide localisés dans des sites de reconnaissance d'une enzyme de restriction, provoquant ainsi la création ou la perte du site de restriction. Ceci permet de définir deux allèles, caractérisés par la présence ou l'absence du site de restriction. Les RFLP tirent leur appellation du fait que les allèles produits sont caractérisés par des fragments d'ADN de tailles différentes selon que le site est présent ou non. La découverte des RFLP en 1980 [1] a fourni une source de marqueurs, *a*

priori nombreux et répartis tout le long du génome, pour réaliser des analyses de liaison génétique. Si suffisamment de marqueurs répartis le long de tous les chromosomes pouvaient être identifiés, une carte génétique de chacun des chromosomes pourrait être réalisée. Pour cela, chaque individu est génotypé pour une série de marqueurs localisés sur tous les chromosomes et une analyse de liaison est réalisée jusqu'à trouver des marqueurs liés entre eux parce que localisés dans la même région chromosomique. Les distances génétiques, exprimées en centimorgan (cM), sont alors calculées et l'ordre des marqueurs est déterminé.

La première carte génétique de l'homme a été publiée en 1986 avec 400 marqueurs. La limite de l'exercice tenait cependant à la lourdeur de la technique du *Southern blot* employée à cette époque pour analyser les RFLP et à la faible informativité (définie comme étant le pourcentage d'hétérozygotes pour le marqueur étudié dans la population), au mieux égale à 50 %, des RFLP. De nombreux individus clés dans les familles se trouvaient à l'état homozygote pour divers marqueurs, limitant ainsi la puissance des analyses de liaison génétique.

Un second type de marqueurs polymorphes, très informatifs, a été découvert au milieu des années 1980. Il s'agit des marqueurs microsatellites caractérisés par des répétitions de courtes séquences (des di-, tri- ou tétranucléotides) dont le nombre d'unités de répétitions permet de définir différents allèles. Le nombre d'allèles peut être élevé (classiquement 5 à 10), et l'informativité des marqueurs est souvent supérieure à 80 %. Ces marqueurs sont trouvés en moyenne tous les 30 kb le long du génome. L'ensemble de ces caractéristiques fait des microsatellites des marqueurs de choix pour réaliser des analyses de liaison génétique. Les microsatellites les plus représentés, et qui ont été utilisés en très grande majorité pour construire la carte génétique du génome humain, sont les répétitions de dinucléotides CA.

Un fait important a été l'invention, également au milieu des années 1980, de la technique de *polymerase chain reaction* (PCR) [3]. Cette technique, qui permet spécifiquement d'amplifier des séquences particulières du génome, s'est révélée parfaitement adaptée au génotypage des microsatellites. En effet, les différents allèles d'un marqueur microsatellite ont des tailles différentes en fonction du nombre d'unités de répétition (CA)_n. La migration des produits de PCR sur des séquenceurs automatiques, dont les premiers modèles ont été commercialisés à la fin des années 1980, a rendu très aisé le génotypage des microsatellites.

ont été utilisés pour identifier dans la banque de BAC le ou les clones qui leur correspondaient. D'autres marqueurs non polymorphes analysables par PCR ont également été utilisés. Des clones chevauchants ont été successivement identifiés, ce qui a permis de construire une carte continue de clones BAC pour chacun des chromosomes. Ceci constitue la carte physique du génome humain (e-figure 3.2).

Un chromosome est représenté sur la gauche avec des marqueurs (microsatellites et autres) symbolisés par des traits horizontaux. Une banque du génome humain cloné dans des BAC a été criblée avec les marqueurs disponibles. Ici 9 marqueurs (m1 à m9) sont indiqués. Les BAC contenant ces différents marqueurs sont identifiés puis ordonnés. Ceci est réalisé pour l'ensemble des marqueurs appartenant à ce chromosome jusqu'à obtenir une suite continue de BAC recouvrant l'ensemble du chromosome.

Séquençage du génome

La carte physique construite avec les BAC a constitué la base pour séquencer chacun des chromosomes. Pour cela, chaque BAC (100–150 kb) a été coupé à l'aide d'enzymes de restriction en fragments chevauchants de quelques centaines de paires de bases qui ont été sous-clonés dans des plasmides et séquencés individuellement par la technique de Sanger. Les séquences chevauchantes obtenues ont été assemblées successivement et les étapes de sous-clonage-séquençage ont été répétées jusqu'à ce que la séquence complète de chaque BAC soit obtenue (figure 3.1).

C'est ainsi que la séquence de chaque chromosome, et donc du génome entier, a été obtenue.

Ce travail a été réalisé par un consortium d'une vingtaine de laboratoires publics. Il s'est déroulé entre 1997 et 2003.

Quelques segments de notre génome demeurent non séquencés et ne pourront peut-être jamais l'être. Ils correspondent à des régions soit difficiles à séquencer, en raison par exemple de leur extrême richesse en nucléotides C et G, soit difficiles à assembler, en raison notamment de la présence de très nombreuses séquences répétées qui empêchent la localisation précise des séquences sur tel ou tel chromosome.

Projet HapMap

Le séquençage du génome humain, issu de plusieurs individus appartenant à des populations différentes, a mis en

évidence l'existence d'un haut degré de polymorphisme. Il a notamment été montré qu'il existe en moyenne une variation d'un nucléotide toutes les 500 bases le long de notre génome. C'est ce que l'on appelle les *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Cette très forte densité de SNP constitue un outil extrêmement utile, et indispensable, pour réaliser des études d'association génétique en vue d'identifier les gènes de prédisposition aux maladies multifactorielles. Afin de tirer tout le parti de ces SNP, un projet appelé HapMap (pour *haplotype map*) a vu le jour en 2002 et s'est déroulé en trois phases jusqu'en 2010. Ce projet avait pour objectif de définir le degré d'informativité de chaque SNP et d'identifier des groupes de SNP se trouvant en déséquilibre de liaison, c'est-à-dire pour lesquels certains allèles ségrégent toujours ensemble sous la forme d'haplotypes. De façon importante, ceci a permis de définir au sein de chaque groupe de SNP un SNP de référence appelé Tag-SNP qui représente tous les autres. Ainsi, ce seul SNP de référence peut être utilisé dans les études d'association, ce qui restreint le nombre de marqueurs à tester et donc le coût (e-figure 3.3).

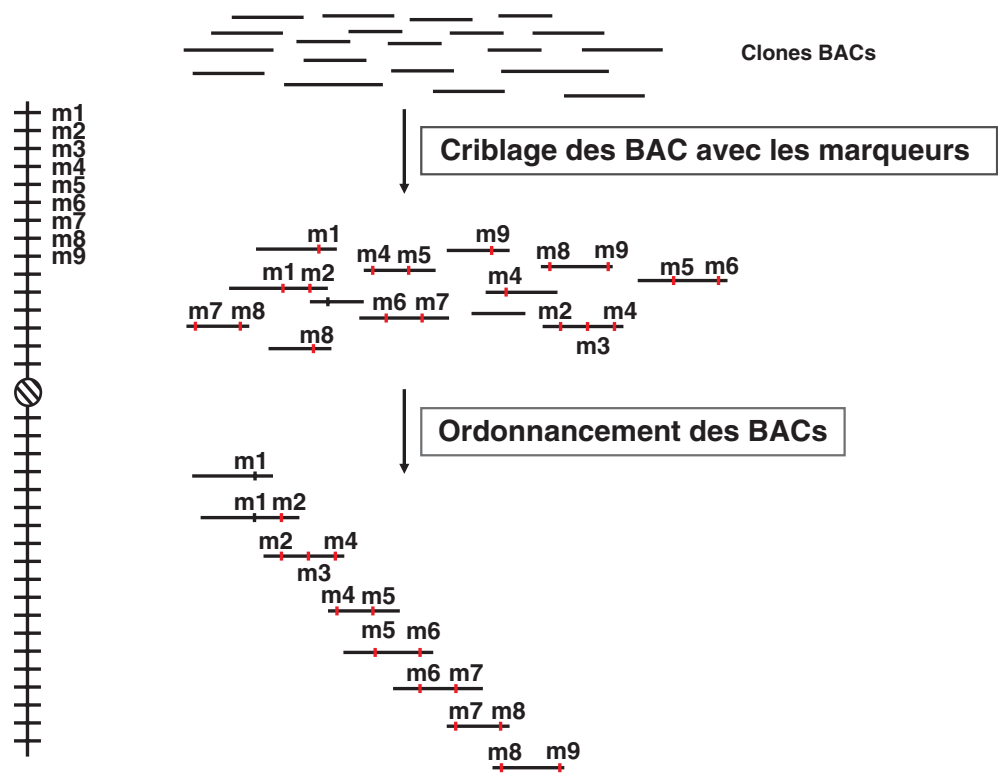
Dans la partie haute de la figure sont indiqués 4 SNP identifiés au sein d'une même région du génome. Le nucléotide variant est en gras, au sein de nucléotides non variants. Les séquences sont indiquées pour un chromosome porté par 5 individus différents.

La partie médiane montre le nucléotide variant de chacun des SNP contenus dans la région étudiée. La succession de ces nucléotides constitue à chaque fois un haplotype. Les traits pointillés permettent de repérer les 4 SNP de la partie haute de la figure.

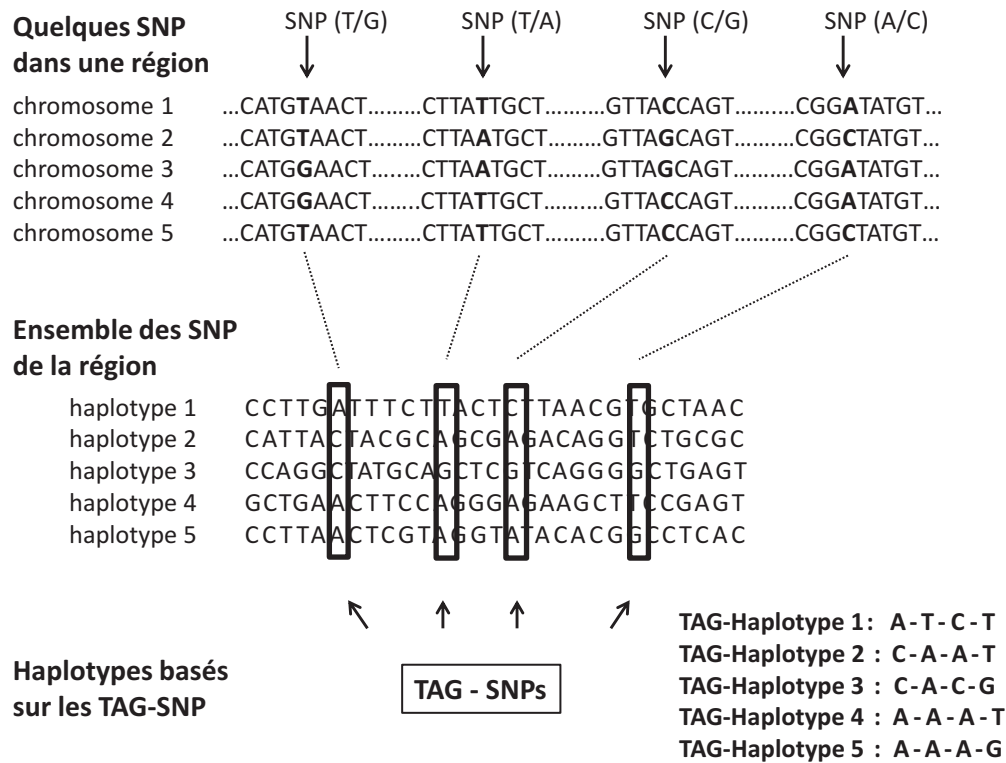
Parmi tous les SNP de la région, 4 sont choisis comme TAG-SNP (encadrés) : ils sont les représentants de l'haplotype considéré et constituent ce que l'on peut appeler un TAG-haplotype.

Projet 1 000 génomes

Avec l'arrivée du séquençage nouvelle génération (NGS, pour *next-generation sequencing*), il est devenu possible de réaliser du séquençage en masse à très faible coût. Le projet 1 000 génomes a pour objectif de dresser un répertoire complet du polymorphisme humain et ceci dans les différentes populations à travers le monde. On sait notamment que les fréquences alléliques des SNP varient d'une population à l'autre. Il est important de caractériser finement ces différences car elles ont, notamment, un effet sur les études d'associations, dans lesquelles il convient de tenir compte de ces différences afin de ne pas fausser les résultats.



e-figure 3.2
Construction de la carte physique.



e-figure 3.3
Cartographie HapMap.

Ainsi le projet « 1 000 » génomes s'est attaché à séquencer le génome de 2 500 individus appartenant à 26 populations différentes (www.1000genomes.org).

Conclusion

Ce sous-chapitre résume le travail réalisé depuis les années 1980 et qui se poursuit aujourd'hui.

La motivation initiale et principale de ce projet était l'identification des gènes impliqués dans les maladies mendéliennes. Aujourd'hui, en France, le diagnostic d'environ 1 500 maladies est rendu possible grâce à l'identification des gènes correspondants.

Le séquençage de l'exome (c'est-à-dire l'ensemble des exons des quelque 23 000 gènes que contient notre génome, soit environ 1 % de l'ensemble du génome), ou du génome entier, disponible depuis le début des années 2010, facilite l'identification des gènes.

Pour ce qui concerne les maladies multifactorielles, la cartographie des SNP par le projet HapMap a rendu pos-

sible l'identification d'un nombre croissant de gènes de prédisposition.

L'obtention de la séquence du génome ouvre des perspectives nouvelles dans des domaines aussi divers que l'étude de la fraction transcrite du génome, la régulation de l'expression des gènes à l'échelle du génome, la pharmacogénétique et la génétique des populations.

Références

- [1] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32 : 314–31.
- [2] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431 : 931–45.
- [3] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51(Pt 1) : 263–73.
- [4] Dib C, Fauré S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380 : 152–4.

ADN codant et non codant dans le génome humain

Le génome humain compte environ 3 milliards de paires de bases d'ADN. Il contient des gènes codant pour des protéines, au nombre de 22 000 à 23 000. Il contient également des gènes qui sont transcrits en ARN de plus ou moins longue taille, mais non traduits en protéines.

Nous définissons ici un gène comme un ensemble de séquences permettant la fabrication d'un produit fonctionnel, qui peut être une molécule d'ARN ou une protéine. Cette définition rend compte à la fois de l'existence de séquences codantes, mais aussi de séquences régulant l'expression du gène, de l'effet observable sur le phénotype de mutations se produisant dans les différents segments fonctionnels du gène, qu'ils soient codants ou régulateurs, et du fait que certains gènes sont transcrits, mais non traduits en protéines.

L'ensemble des gènes codants et non codants est dispersé au sein du génome, entrecoupé par des séquences dites intergéniques qui représentent environ 90 % de notre génome et dont le contenu et le rôle demeurent encore largement méconnus mais commencent aujourd'hui à être décryptés.

Dans ce chapitre nous décrivons ce que l'on sait de l'organisation, de la structure et des rôles des gènes et des séquences intergéniques.

Les gènes codant pour des protéines

Un gène codant pour une protéine est transcrit dans le noyau en ARN prémessager qui est épissé pour donner l'ARN messager (ARNm). Ce dernier traverse la membrane nucléaire pour passer dans le cytoplasme où il est traduit en protéine au niveau des ribosomes.

Un gène codant pour une protéine comporte (figure 3.4) :

- les exons, qui contiennent les séquences codantes du gène, traduites en protéine en suivant le code génétique. Il faut noter que le premier exon débute généralement par des séquences non traduites (dites séquences 5' non traduites; 5'UTR en anglais pour 5' *untranslated region*).

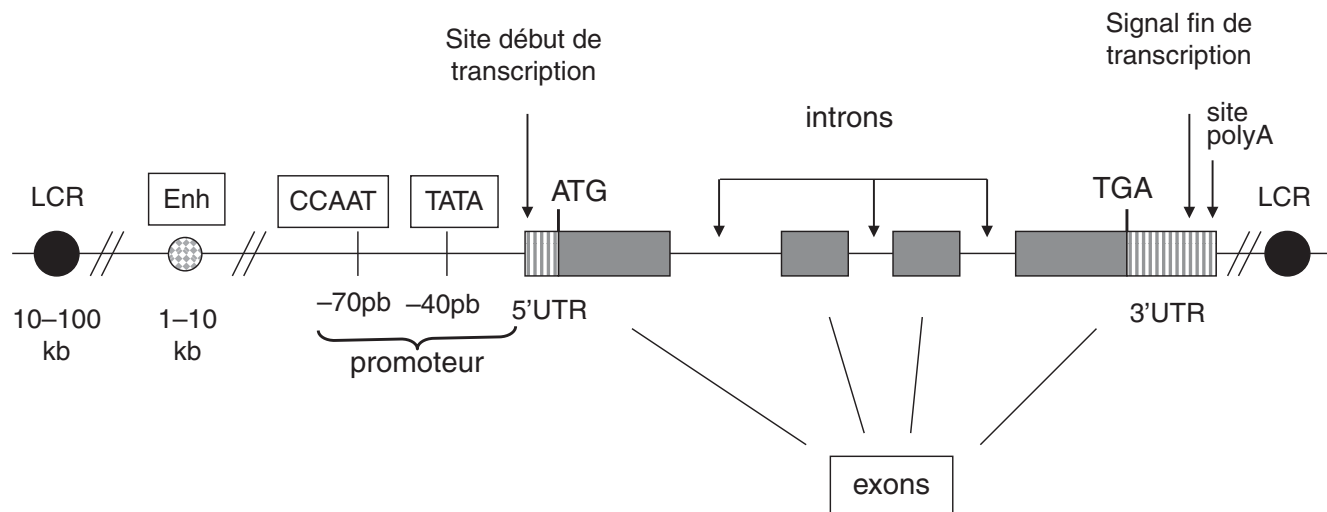


Figure 3.4

Structure d'un gène.

Les exons sont représentés par des boîtes rectangulaires. Les parties hachurées correspondent aux régions 5' et 3' non traduites (5'UTR et 3'UTR). Les introns sont représentés par une ligne continue. Le site d'initiation et signal de fin de transcription et le site de polyadénylation sont indiqués. ATG : site d'initiation de la traduction. TGA : codon STOP. TATA, CCAAT : TATA box et CCAAT box. Enh : *enhancer*. LCR : *locus control region*.

Le 5'UTR peut dans certains cas englober tout le premier exon et une partie du second exon. De même le dernier exon se termine généralement par des séquences non traduites (dites séquences 3' non traduites; 3'UTR).

- La transcription du gène démarre sur la première base de l'exon 1 du gène (site d'initiation de la transcription).
- La traduction en protéine démarre quant à elle sur l'ARNm au niveau du site d'initiation de la traduction défini par un codon ATG codant pour l'acide aminé méthionine. La traduction en protéine s'arrête au niveau du codon STOP (TAG, TGA ou TAA). À noter également l'existence d'un site de polyadénylation qui permet l'ajout d'une queue polyA à l'ARN messager;
- les introns, qui sont intercalés entre les exons. Les jonctions entre les exons et les introns constituent ce que l'on appelle les sites d'épissage (donneurs et accepteurs);
- des éléments régulateurs. Les quelques dizaines ou centaines de paires de base situées en amont du site d'initiation de la transcription constituent le promoteur du gène qui contient des séquences telles que la TATA box et la CCAAT box, et d'autres séquences liant des facteurs et des cofacteurs de transcription. Il est à noter que des séquences régulatrices peuvent se situer également dans les introns des gènes, notamment parce que des gènes de petits ARN non codants (voir ci-dessous) sont volontiers assemblés en groupes (ou clusters) dans les introns. Des éléments régulateurs peuvent être également localisés à grande distance des séquences transcrites. Nous en parlerons plus loin.

Les gènes transcrits en ARN non codants

Notre génome contient plusieurs classes de gènes qui sont transcrits en ARN ne codant pas pour des protéines et qui sont dits « non codants ». Il en existe trois classes, dont les représentants sont rassemblés en *clusters* dans certaines régions génomiques.

Les petits ARN nucléaires, snRNA (pour *small nuclear RNA*), entrent dans la composition de complexes ribonucléoprotéiques appelés *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP) qui sont impliqués dans l'épissage des ARN pré-messagers.

Les petits ARN nucléolaires, *small nucleolar RNA* (snoRNA), dont il existe environ 400 représentants, ont pour rôle la modification post-transcriptionnelle des ARN ribosomiques (ARNr) au niveau du nucléole. En association avec des protéines ils forment les *small nucleolar ribonucleoprotein* (snoRNP) qui vont modifier de façon spécifique certains nucléotides des ARNr, soit par 2'-O-méthylation soit par pseudo-uridylation.

Les micro-ARN, miRNA, dont il existe près de 1900, jouent un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes codant pour des protéines en s'appariant avec des séquences homologues dans la région 3' non traduite des ARNm. Ils provoquent soit une dégradation de l'ARNm, soit empêchent sa traduction en protéine et régulent donc de façon négative l'expression des gènes.

Les ARN de transfert, tRNA, pour lesquels il existe près de 500 gènes, sont chargés d'apporter les acides aminés au niveau des ribosomes lors de la synthèse des protéines.

Éléments régulateurs à distance des séquences transcrites

Notre génome est loin d'avoir pour unique fonction de coder pour des protéines. Seuls les exons codants remplissent cette fonction. Ils ne représentent qu'environ 1 % de l'ensemble de notre génome.

On sait aujourd'hui que des éléments de régulation de l'expression des gènes peuvent se situer à plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines, de kilobases en amont des séquences exprimées. Ces éléments sont les séquences dites amplificatrices de l'expression (ou *enhancer* en anglais). Il existe également des séquences dites « régions de contrôle de locus » (*locus control region*, LCR), parfois aussi appelées séquences insultrices (e-figure 3.5) qui encadrent le gène, ou parfois un groupe de gènes, et bornent une région génomique pour en quelque sorte l'isoler du reste du génome et permettre la régulation fine, spatiale et temporelle des gènes contenus dans ce segment.

L'existence de ces éléments régulateurs localisés à distance des séquences exprimées a été longtemps suspectée car certains patients atteints d'une pathologie génétique n'avaient pas de mutation dans le gène normalement impliqué. Certains patients avaient une translocation chromosomique avec l'un des points de cassure localisé à quelques dizaines ou centaines de kilobases du site d'initiation de la transcription du gène, laissant supposer que le point de cassure chromosomique soit interrompait un *enhancer* soit séparait un *enhancer* de la région promotrice du gène, empêchant ainsi une interaction nécessaire à l'expression du gène (e-figure 3.5a). On parle d'effet de position.

Ces éléments de régulation correspondent généralement à des séquences conservées au cours de l'évolution. Des séquences conservées au cours de l'évolution sont des séquences soumises à une pression de sélection en raison de leur importance fonctionnelle. Ainsi, alors que les séquences intergéniques sont globalement peu conservées d'une espèce à l'autre, on trouve par endroits des séquences de quelques centaines, parfois quelques milliers, de bases qui sont très conservées. Ces séquences sont appelées éléments non codants très conservés (HCNE, pour *highly conserved non-coding elements*).

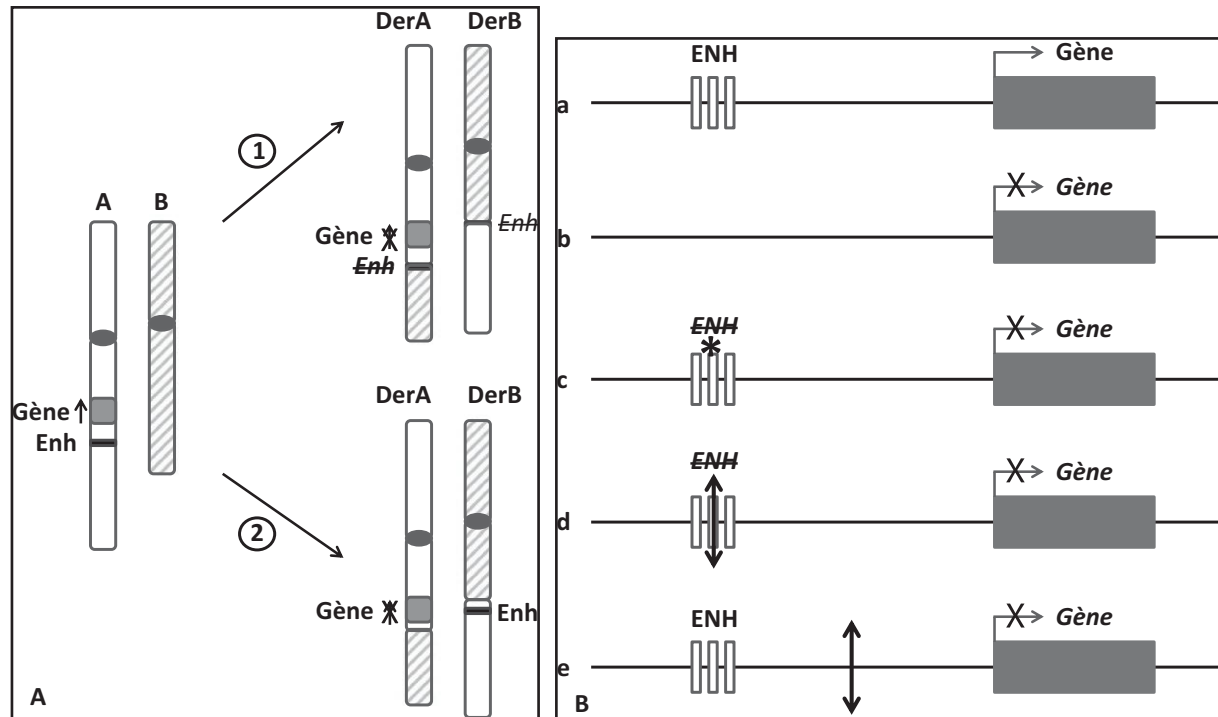
De tels éléments ont été trouvés en amont du gène *SOX9* sur le chromosome 17. Des mutations de ce gène sont

responsables de la dysplasie campomélique. Des patients avec cette maladie, mais sans mutation identifiée dans les exons du gène, sont porteurs de translocations avec un point de cassure situé aussi loin que 900 kb en amont du gène. Par ailleurs, des analyses de cartographie ont montré que le gène responsable d'une autre maladie, la séquence de Pierre-Robin (SPR), était localisé dans la même région 17q24. Aucune mutation du gène *SOX9* ni des autres gènes présents dans la région n'a été trouvée chez les patients SPR. Par contre, trois patients avaient des points de cassure de translocation localisés à environ 1,4 mégabase (1,4 million de bases, Mb) en amont de *SOX9*. L'analyse de la séquence de la région comprenant ces trois points de cassure chromosomique a montré l'existence de plus de 200 HCNE. Des analyses fines de cette région ont montré chez certains patients SPR l'existence de délétions emportant tout ou partie des HCNE. L'une des délétions comportait 10 HCNE qui ont été séquencés chez différents patients. Chez l'un d'entre eux a été trouvée une mutation ponctuelle dans un HCNE. Des études complémentaires ont montré que ces HCNE jouaient un rôle d'*enhancer* sur le promoteur du gène *SOX9*. L'ensemble de ces résultats indique que la séquence de Pierre-Robin est due, chez certains patients du moins, à une dérégulation du gène *SOX9* par des délétions ou des mutations des HCNE [1].

Ceci démontre l'implication de HCNE dans la régulation de l'expression de gènes et leur implication possible dans certaines pathologies (e-figure 3.5b). Ainsi, même si l'on considère qu'environ 90 % des mutations pathogènes sont localisées dans les séquences codantes des gènes, il convient de ne pas négliger l'étude des éléments régulateurs, qui peuvent être dans certains cas localisés à grande distance des séquences codantes, en amont ou en aval des gènes.

Répertoire des éléments fonctionnels dans le génome humain

Le séquençage du génome humain a fourni la séquence précise des 24 chromosomes humains. Cependant, notre compréhension du fonctionnement du génome demeure encore limitée, notamment pour ce qui concerne les transcrits ne codant pas pour des protéines et les éléments génomiques qui régulent l'expression spatiale et temporelle des gènes. Il était donc nécessaire d'explorer l'intégralité du génome pour établir un répertoire de l'ensemble des éléments fonctionnels du génome. Ceci a constitué la base du projet ENCODE (*Encyclopedia of DNA elements*) réalisé par



e-figure 3.5

Régulation de l'expression des gènes par des *enhancers* localisés à distance des séquences transcrites.

A. Effet d'une translocation sur l'expression d'un gène. Deux chromosomes, A en blanc, et B en gris hachuré, sont représentés. Sur le chromosome A est représenté un gène dont l'expression est sous la dépendance d'un *enhancer* (Enh) localisé à une certaine distance en amont. La flèche indique le sens de transcription du gène. Une translocation entre les deux chromosomes A et B se produit. Deux possibilités sont représentées : 1. Le point de cassure de la translocation sur le chromosome A est localisé au niveau de l'*enhancer*, dont une partie reste sur le chromosome dérivatif A (DerA) et l'autre partie se retrouve sur le chromosome dérivatif B (DerB). L'*enhancer* ainsi interrompu perd sa fonction. Le gène n'est plus transcrit (ceci est symbolisé par un X sur la flèche indiquant le sens de transcription du gène). 2. Le point de cassure de la translocation sur le chromosome A est situé entre l'*enhancer* et le gène. Ceci a pour conséquence de séparer l'*enhancer*, qui se retrouve sur le chromosome dérivatif B (DerB) du gène, qui reste sur le chromosome dérivatif A (DerA).

B. Différentes possibilités d'abolition du contrôle de l'expression d'un gène par un *enhancer*. a. Schéma d'un segment chromosomique comprenant un gène (rectangle gris) dont l'expression est sous le contrôle d'un *enhancer* (ENH, représenté par trois rectangles blancs). La transcription du gène est figurée par une flèche. b. Délétion de l'*enhancer* (les rectangles blancs ne sont pas présents). Ceci a pour effet d'empêcher la transcription du gène (la flèche indiquant la transcription du gène est barrée par un X). c. Une mutation ponctuelle (indiquée par un astérisque) s'est produite au niveau de l'*enhancer*. Ceci a pour effet d'empêcher la transcription du gène. d. Une translocation se produit au niveau même de l'*enhancer* et le point de cassure abolit sa fonction. Ceci a pour effet d'empêcher la transcription du gène. e. Une translocation provoque une cassure entre l'*enhancer* et le gène. Le point de cassure sépare l'*enhancer* du gène et empêche par conséquent l'expression du gène.

un très large consortium international de laboratoires [2] (www.encodeproject.org).

Un élément fonctionnel est défini comme un segment du génome qui code pour un produit défini (par exemple une protéine ou un ARN non codant) ou qui comporte une signature biochimique reproductible (par exemple, la capacité à lier une protéine telle qu'un facteur de transcription, ou une structure chromatinienne spécifique). Ces éléments ont été étudiés par diverses stratégies expérimentales dans près de 150 types cellulaires différents.

Il est frappant de constater que 75 % du génome est transcrit en molécules d'ARN de plus de 200 nucléotides. Seuls 5,5 % des transcrits sont issus d'exons, le restant étant issu des introns et régions intergéniques. En outre, ont été identifiés environ 7000 petits ARN (miRNA, snRNA, snoRNA, tRNA). Ces chiffres sont de façon certaine sous-estimés puisque l'ensemble des types cellulaires n'a pas été investigué et que d'autres transcrits ont vraisemblablement échappé à l'analyse.

Parmi les 7000 petits ARN, 40 % sont issus des régions promotrices ou terminales des gènes. De même, les *enhancers*, qui contiennent souvent des HCNE, sont pour partie le siège de l'initiation de la transcription de molécules d'ARN qui s'étendent sur plusieurs kilobases et l'altération de ces ARN pourrait être impliquée dans la pathogenèse de certaines maladies génétiques. Il est à noter également que 18 % des transcrits sont issus d'éléments répétés du génome (*SINE* dont les séquences de type *Alu*; *LINE* dont les séquences de type L1, notamment); ces transcrits semblent avoir un rôle dans la spécificité cellulaire. Lorsque l'on sait que 10,5 % du génome est occupé par des séquences répétées, cette découverte permet désormais d'entrevoir leur rôle probable sur la régulation du génome.

On pourrait légitimement se demander si cette multitude de transcrits a une réelle fonction ou correspond à un simple bruit de fond de transcription du génome. Un certain nombre d'exemples suggèrent cependant que ces ARN non codants sont doués de fonctions, ainsi que le montrent les quelques illustrations ci-dessous.

Concernant les petits ARN non codants, certains sont connus pour intervenir dans la formation de l'hétérochromatine. Nombre de petits ARN inclus dans des introns ont une complémentarité pour des gènes codant pour des protéines et peuvent réguler (généralement de façon négative) l'expression des gènes dans les introns desquels ils sont inclus. Par ailleurs, il a été observé qu'un choc thermique provoquait la transcription de séquences répétées de type *Alu* en molécules d'ARN qui peuvent réprimer l'ARN polymérase II à des loci spécifiques et jouer par conséquent un rôle de répresseurs de l'expression de

certaines gènes. Enfin, les miRNA peuvent être processés à partir de l'un ou l'autre des brins de la même structure en épingle à cheveux qui les constitue, et peuvent être issus à la fois de transcrits sens et antisens du même locus, augmentant ainsi la capacité à produire de multiples micro-ARN avec des cibles différentes.

Pour ce qui concerne les longs ARN non codants (lncRNA), le rôle de l'ARN *Xist* est bien connu dans l'inactivation du chromosome X, et d'autres sont impliqués dans le phénomène d'empreinte génomique parentale (voir [chapitre 21, «Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées»](#)). Certains lncRNA pourraient jouer un rôle dans la transmission d'information d'une génération à la suivante et contribuer à la régulation épigénétique du génome. Par ailleurs, *HOTAIR*, l'un des 231 lncRNA associés aux *clusters* de gènes *HOX* et exprimés de façon colinéaire le long des axes de développement, est transcrit à partir du locus *HOXC* et réprime le *cluster HOXD*, indiquant le rôle de certains de ces longs ARN dans le contrôle du développement embryonnaire. Enfin, il a été découvert que de nombreux lncRNA apparaissent rapidement et que certains ont connu une sélection positive, comme *HAR1* qui est exprimé dans le cerveau humain et constitue la séquence du génome humain qui a le plus rapidement divergé après la séparation homme-chimpanzé. Ainsi, les lncRNA pourraient être le support d'innovations majeures au cours de l'évolution.

Perspectives

Une description complète du contenu du génome est indispensable pour comprendre comment le génome orchestre les différents et complexes processus biologiques au cours de la vie. Nous voyons bien que les découvertes récentes concernant le niveau de transcription global du génome à partir de séquences très diverses ouvrent des perspectives nouvelles concernant la régulation fine de l'expression des gènes à l'échelle du génome. De façon un peu provocatrice, on peut même penser que les lncRNA pourraient plus contribuer à la spécificité cellulaire que les gènes codant pour des protéines. On entrevoit aussi que des anomalies du génome altérant l'expression d'ARN non codants peuvent entraîner des dérégulations à l'origine de maladies génétiques et entraîner une prédisposition à des maladies multifactorielles.

Nous avons ici évoqué essentiellement la description de l'ensemble des transcrits, mais le paysage de notre génome comprend d'autres éléments fonctionnels, dont la caracté-

risation vient compléter notre compréhension du fonctionnement intégré du génome et qui ont été pris en compte par le projet ENCODE. Ces éléments fonctionnels sont : les sites de liaisons de protéines (par exemple, les facteurs de transcription), les zones de la chromatine de conformation ouverte (sensibles à la DNase), les régions associées de façon spécifique à des profils particuliers de modification des histones (acétylation, mono-, di- ou triméthylation de résidus lysines, caractéristiques, selon les types de modification, de régions actives ou silencieuses transcriptionnellement ou d'éléments tels que certains *enhancers*, etc.), et le degré de méthylation de l'ADN.

Enfin, un important champ d'investigation concerne les interactions à distance entre séquences génomiques distantes de plusieurs centaines ou milliers de kilobases. Ces interactions peuvent avoir lieu au sein d'un même chromosome (elles sont alors dites « en *cis* ») et autorisent, par exemple, après repliement de la chromatine, la mise en contact d'un élément *enhancer* avec un promoteur pour activer l'expression d'un gène. Ces interactions peuvent aussi avoir lieu entre des séquences localisées sur des chromosomes différents (dites « en *trans* ») indiquant l'existence d'un degré supplémentaire de régulation du génome.

Un champ nouveau d'étude du génome concerne la topographie des chromosomes à l'intérieur du noyau. Chaque chromosome occupe en effet une place spécifique au sein du noyau, certains étant situés au centre, d'autres en position plus périphérique. On parle de territoire chromosomique [3]. Au sein même de chaque chromosome, les différentes régions ont des positionnements plus ou moins centraux ou périphériques. Il a été montré que les régions actives sur le plan transcriptionnel occupaient des positions centrales, alors que les séquences localisées en périphérie du noyau étaient préférentiellement silencieuses. On comprend donc

que des séquences appartenant à des chromosomes différents, mais colocalisées spatialement dans le noyau, ont des probabilités plus élevées d'entrer en contact, ceci pouvant aboutir à la corégulation de gènes situés sur des chromosomes différents. Par ailleurs, on comprend tout aussi facilement que des remaniements chromosomiques tels que des translocations, ou des délétions, duplications ou inversions de larges régions du génome peuvent entraîner une relocalisation aberrante d'un chromosome ou d'une portion de chromosome dans un nouvel environnement au sein du noyau. Ceci peut provoquer la dérégulation de l'expression d'un ou plusieurs gènes et/ou altérer les interactions avec d'autres régions chromosomiques (soit en les abolissant soit en en créant de nouvelles) [4].

Ceci engendre un mécanisme supplémentaire pour expliquer certaines maladies génétiques. Ainsi, notre vision du fonctionnement normal de notre organisme et des mécanismes physiopathologiques à l'origine de maladies doit-elle prendre en compte non seulement ce qui se passe au niveau d'un gène ou d'un groupe de gènes particuliers, mais intégrer une conception globale à l'échelle du génome.

Références

- [1] Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, et al. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat Genet* 2009; 41 : 359–64.
- [2] Encode Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; 489 : 57–74.
- [3] Dostie J, Bickmore WA. Chromosome organization in the nucleus – charting new territory across the Hi-Cs. *Current Opinion in Genetics & Development* 2012; 22 : 125–31.
- [4] Harewood L, Fraser P. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Human Molecular Genetics*, 2014; 23(R1) : R76–82.

Polymorphisme du génome humain

L'analyse du génome depuis plus de trente ans a montré l'existence de polymorphismes de l'ADN de divers types. Le terme de polymorphisme, au sens littéral, indique le fait qu'une séquence d'ADN peut prendre plusieurs formes. Ce sous-chapitre décrira les différentes classes de variations de séquences qui ont été mises en évidence. Son intitulé indique combien notre génome est différent d'un individu à l'autre.

Il convient dans un premier temps de rappeler quelques définitions. Lorsque l'on compare le génome d'un individu au génome dit « de référence », un grand nombre de différences est observé. Ces différences sont appelées des variants. Certains de ces variants, rares, sont responsables de maladies génétiques : on les appelle alors des mutations. La plupart des variants sont, autant que l'on puisse dire, sans effet sur le phénotype de l'individu et

sont communément représentés dans la population : on les appelle des polymorphismes. Dans certains cas, il est difficile de distinguer si un variant est une mutation ou un simple polymorphisme : il garde alors le nom de variant, de façon neutre, dans l'attente d'arguments permettant de le qualifier plus précisément.

Les variants peuvent être localisés dans tout type de séquence de notre génome : dans les gènes (exons, introns, séquences régulatrices) ou entre les gènes. Il faut donc toujours apprécier l'effet que peut avoir le variant considéré sur le bon fonctionnement du génome, en prenant en compte le type de variant et sa localisation.



Remarque

Mutations, polymorphismes, variants, variations de séquence

Au sens strict, le terme « mutation » désigne n'importe quel changement intervenu dans la séquence de l'ADN, sans préjuger de sa pathogénicité à l'échelle du gène ou du chromosome.

Cette définition est celle que l'on peut trouver dans de nombreux ouvrages de génétique et de génomique. Néanmoins, l'utilisation correcte de ce terme en génétique médicale s'associe à un effet pathogène.

Une question similaire de définition concerne le terme « polymorphisme », qui doit aujourd'hui être défini comme « une variation génomique non pathogène ». Certains définissent le terme « polymorphisme » comme une « variation génomique présente à une fréquence supérieure ou égale à 1 % dans la population ». Cette définition ne doit pas être retenue, d'une part car le chiffre de 1 % est arbitraire et, d'autre part, car certaines mutations avérées sont présentes à l'état hétérozygote dans la population à une fréquence supérieure à 1 %. C'est le cas par exemple de la mutation $\Delta F508$ du gène *CFTR*, présente à l'état hétérozygote chez 2 à 3 % des individus de la population et qui est la mutation la plus fréquente responsable de mucoviscidose.

Cette problématique de sémantique a conduit la Human Genome Variation Society (HGVS, www.hgvs.org) à recommander l'utilisation des termes « variants » ou « variations de séquence », ayant un sens plus neutre et qui ne préjugent pas d'un effet délétère ou non. Concernant les effets délétères ou non de variants de séquence,

il est important de souligner que des variants génomiques ayant un effet délétère peuvent être présents chez un individu, sans pour autant être responsables de la pathologie chez ce patient. Pour un patient atteint d'une pathologie de cause génétique, il faut donc bien distinguer la présence de variants délétères impliqués dans la pathologie que présente ce patient et les variants à effet délétère (en ce qui concerne l'effet sur la fonctionnalité du gène concerné) mais n'étant pas responsables de la pathologie. À ce propos, les données issues du « 1000 Genomes Project » (www.1000genomes.org) ont permis d'estimer que chaque individu est porteur en moyenne de 2 500 variants de type faux-sens touchant des régions conservées (dont 20 à 40 probablement à effet délétère) et de 150 variants à effet « perte de fonction » (de type non-sens, décalage du cadre de lecture, ou touchant des sites d'épissage).

Nous avons fait dans ce livre le choix de rester au plus proche de la pratique médicale courante et ainsi d'utiliser le terme de « mutation » pour désigner strictement une variation génétique à effet délétère.

Variants d'un nucléotide (SNV, pour *single nucleotide variant*)

La comparaison de la séquence de différents génomes indique qu'en moyenne un nucléotide tous les 500 nucléotides est variant. Cela signifie que notre génome, qui compte 3 milliards de paires de bases, comporte environ 6 millions de variants de ce type, que l'on appelle des SNV (pour *single nucleotide variant*). Dans la plupart des cas, le SNV peut prendre deux formes différentes, c'est-à-dire que le nucléotide de référence peut être remplacé par un autre, toujours le même : par exemple un A remplacé par un C. Le SNV est alors dit biallélique car il y a deux allèles possibles. Plus rarement, le nucléotide de référence peut être remplacé par un choix de deux nucléotides (A remplacé par C ou T, par exemple) ou trois nucléotides (A remplacé par C, T ou G). On parle alors de SNV tri- ou tétra-allélique, respectivement. On décrit pour chacun des SNV la fréquence des différents allèles dans la population. Pour un SNV biallélique, l'informativité (définie comme le pourcentage d'hétérozygotes) maximale de 50 % est obtenue si les deux allèles ont la même fréquence de 50 % dans la population considérée.

Le terme de SNV est neutre, en ce sens qu'il ne comporte pas de connotation quant à la pathogénicité du variant. Les SNV sont situés à travers tout le génome. Certains sont localisés dans des gènes, d'autres en dehors des gènes. Si un SNV est responsable d'une maladie génétique, on l'appelle une mutation. Les SNV non pathogènes sont appelés des SNP (pour *single nucleotide polymorphism*). Certains SNP sont *a priori* sans effet sur le fonctionnement d'un gène et sont neutres. D'autres peuvent faiblement altérer la fonction d'un gène : il peut s'agir, par exemple, d'un SNP localisé dans la séquence codante d'un gène et introduisant un variant faux-sens avec un effet peu important sur la fonction de la protéine codée par le gène, ou d'un SNP situé dans la région régulatrice et qui peut avoir un effet faible sur le niveau d'expression du gène. Ces SNP sont dits fonctionnels (en raison de l'effet possible ou avéré sur la fonction d'un gène) et peuvent éventuellement constituer des polymorphismes de prédisposition à des maladies multifactorielles.

En raison de leur grand nombre et de leur présence tout le long du génome, les SNP constituent des marqueurs très utiles pour effectuer une cartographie à l'échelle du génome ou ciblée sur telle ou telle région chromosomique d'intérêt particulier. L'établissement d'un répertoire exhaustif des SNP et leur caractérisation dans les diverses populations appartenant aux cinq continents font l'objet des projets HapMap et 1 000 génomes (se reporter au sous-chapitre « Projet "Génome humain" »). Le caractère binaire de ces polymorphismes (présence de l'un ou l'autre des allèles, pour ce qui concerne les SNP bialléliques) et le développement de techniques de génotypage peu onéreuses permettent la réalisation d'analyses en masse de panels de plusieurs centaines de milliers de SNP simultanément (classiquement entre 250 000 et 1 000 000) sur des cohortes de plusieurs centaines ou milliers d'individus dans des études d'association visant notamment à identifier des marqueurs de prédisposition aux maladies complexes.

L'ensemble des SNP est répertorié dans des bases de données telles que dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) et le projet 1 000 génomes (www.1000genomes.org).

Les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP, pour *restriction fragment length polymorphism*) sont des SNP particuliers en ce sens qu'ils touchent des sites de reconnaissance d'enzymes de restriction, en abolissant ou en créant un site (e-figure 3.6). Ce sont les premiers polymorphismes de l'ADN à avoir été mis en évidence en 1980 [1]. Détectés à l'époque par la technique du *Southern blot*, ils sont aujourd'hui analysés plus aisément par la technique de PCR suivie de la digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction concernée. Leur analyse

peut difficilement être automatisée, et les RFLP sont aujourd'hui peu utilisés.

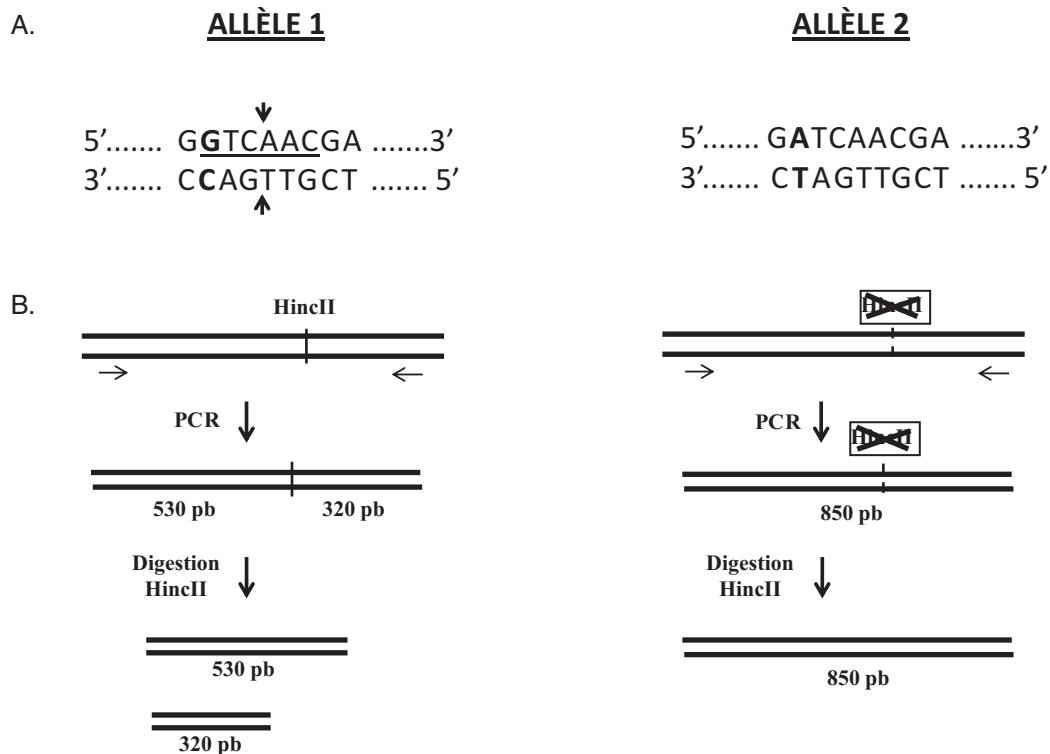
Microsatellites

Les microsatellites sont des répétitions de courtes séquences (des di-, tri- ou tétranucléotides) dont le nombre d'unités de répétitions permet de définir différents allèles. Le nombre d'allèles peut être élevé (classiquement 5 à 10) et l'informativité de ces marqueurs est le plus souvent supérieure à 80 % (e-figure 3.7). Par exemple, pour un marqueur ayant 10 allèles, si chacun des allèles a une fréquence de 10 % dans la population, l'informativité sera de 90 %. Ces marqueurs sont trouvés en moyenne tous les 30 kb le long du génome. Les microsatellites les plus représentés sont les répétitions de dinucléotides CA. Ces marqueurs, en raison de leur grande informativité et de la relative facilité avec laquelle ils peuvent être génotypés, ont été utilisés pour construire la carte génétique du génome humain. Ils sont aujourd'hui délaissés pour les études à grande échelle au profit des SNP.

Nous mentionnerons ici d'autres polymorphismes multialléliques, les minisatellites, qui sont des répétitions en tandem d'unités de répétition dont la longueur est classiquement comprise entre 20 et 100 paires de bases. Ces minisatellites ont eu leur heure de gloire durant les années 1980 car ils ont été les premiers marqueurs utilisés pour effectuer des empreintes génétiques en médecine légale. Ils sont maintenant remplacés pour ces analyses par un panel de microsatellites utilisé par tous les laboratoires à travers le monde.

Variants de nombre de copies (CNV, pour *copy number variation*)

L'analyse du génome par la technique d'hybridation génomique comparative sur puces à ADN (CGH-array) a permis de mettre en évidence l'existence de délétions et de duplications de segments d'ADN dont la taille peut s'échelonner entre quelques milliers et quelques millions de paires de bases, regroupées sous le nom de CNV (pour *copy number variation*). S'il était bien connu que certaines de ces anomalies de structure chromosomique étaient responsables de maladies génétiques, ou de syndromes microdélétionnels, en raison de la perte des gènes contenus dans les segments délétés, la découverte de ces variations de structure chez des individus de la population générale a constitué une

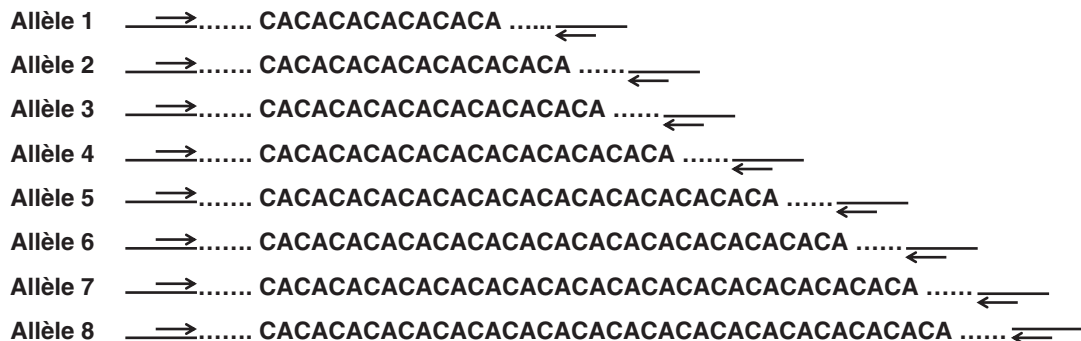


e-figure 3.6

Polymorphisme de type RFLP (pour restriction fragment length polymorphism).

A. Les séquences partielles de deux allèles sont présentées. L'allèle 1 comporte le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction HincII (GTCAAC, souligné). L'allèle 2 ne comporte pas le site de reconnaissance de HincII en raison du remplacement d'un G par un A (ATCAAC). Les nucléotides variants (G et A) sont indiqués en gras. Les flèches indiquent le site de coupure par l'enzyme HincII.

B. L'ADN englobant le site polymorphe est représenté par un double brin. L'emplacement du site HincII est indiqué par un trait vertical plein (site présent sur l'allèle 1) ou pointillé (site absent sur l'allèle 2). Les flèches indiquent les amorces utilisées pour la PCR permettant de synthétiser un fragment de 850 pb. La digestion de l'allèle 1 par HincII produit deux fragments de 530 pb et 320 pb. L'allèle 2 n'est quant à lui pas digéré par HincII car le site de reconnaissance est absent.



e-figure 3.7

Microsatellites.

Un exemple de microsatellite avec une répétition de dinucléotides CA est représenté. Les 8 allèles de ce microsatellite diffèrent par le nombre de CA. Les flèches indiquent les amorces, localisées dans des séquences spécifiques flanquant le microsatellite, permettant l'amplification par PCR. Chaque allèle se distingue des autres par sa taille, mesurée en paires de bases à l'aide d'un séquenceur automatique.

surprise, d'autant plus que les segments concernés peuvent contenir plusieurs gènes. Étant trouvés dans la population générale sans être associés à une pathologie apparente, ces événements constituent donc des polymorphismes. On les appelle des CNP (pour *copy number polymorphism*) [2].

Ces polymorphismes sont nombreux et trouvés à travers l'ensemble du génome. On considère qu'entre 5 % et 10 % du génome sont concernés par ces polymorphismes. Ceci constitue une surprise pour un génome diploïde dont on considèrerait jusque-là que son intégrité en termes de nombre de copies devait être scrupuleusement respectée. On se rend compte désormais que, selon qu'il s'agit d'une délétion ou d'une duplication et que l'individu est hétérozygote ou homozygote pour le polymorphisme, un individu peut être porteur de 0, 1, 2, 3 ou 4 copies de certains segments d'ADN.

Outre les délétions et duplications, les variants structuraux comprennent aussi des inversions intrachromosomiques, qui sont toutefois moins nombreuses.

D'un point de vue mécanistique, l'apparition de ces variants de structure récurrents s'explique, pour certains d'entre eux du moins, par l'existence de séquences d'ADN de plusieurs kilobases d'ADN fortement homologues (> 90 %)

et qui flanquent le variant (e-figure 3.8). Ces séquences s'appellent des duplications segmentaires. Leur présence de part et d'autre du variant augmente la probabilité qu'intervienne une recombinaison homologue, entraînant selon les cas une délétion, une duplication ou une inversion.

Les CNV sont répertoriés dans des banques de données, notamment la *Database of Genomic variants* (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) et Decipher (<https://deciphersanger.ac.uk>).

En raison de la fraction du génome concernée et de la taille et du contenu en gènes de certains d'entre eux, les CNV ont été rapidement considérés comme de possibles facteurs de prédisposition aux maladies multifactorielles. De fait, plusieurs études ont montré que certains CNV étaient associés à des maladies non mendéliennes.

Références

- [1] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32 : 314–31.
- [2] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444 : 444–54.

ENTRAÎNEMENT 3 QCM-QROC

Le projet « Génome humain »

QCM 1

La carte génétique a été construite à l'aide de :

- A. Marqueurs polymorphes
- B. Marqueurs non polymorphes
- C. RFLP
- D. Microsatellites
- E. SNP

QCM 2

La carte génétique :

- A. A été construite par analyse de liaison génétique
- B. Représente la localisation de chacun des gènes de notre génome
- C. Répertorie tous les gènes de notre génome
- D. N'a finalement eu aucun impact sur le déroulement du projet génome humain
- E. A été un prérequis pour construire la carte physique du génome

QCM 3

La carte physique :

- A. Représente l'ordre des marqueurs microsatellites le long du génome
- B. A été constituée par l'assemblage de BAC ordonnés
- C. A été construite après criblage des BAC uniquement avec des marqueurs non polymorphes

- D. A ensuite permis le séquençage du génome
- E. A été construite après le séquençage du génome

QCM 4

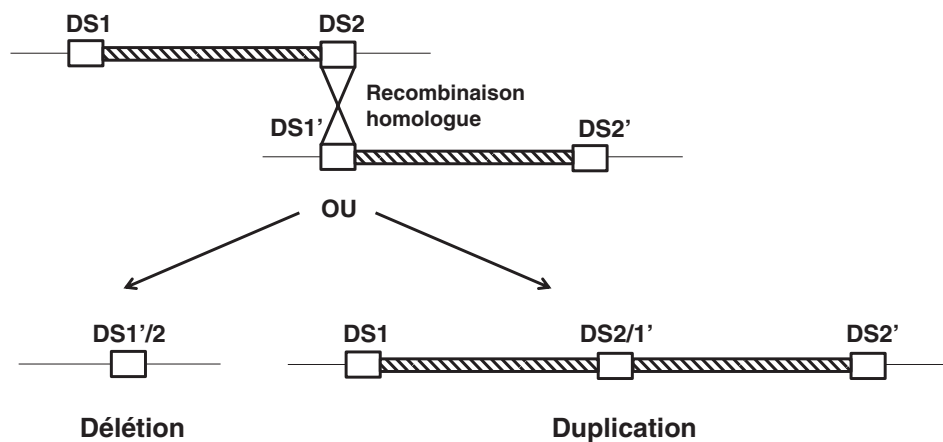
HapMap et projet 1 000 génomes :

- A. Sont des phases du projet génome consécutives du séquençage du génome
- B. Ont pour objet de caractériser l'ensemble des SNP
- C. HapMap a permis de sélectionner des SNP représentatifs des différentes régions du génome
- D. Le projet 1 000 génomes a pour objet de séquencer 1 000 fois le même génome
- E. Le projet 1 000 génomes répertorie l'ensemble des polymorphismes dans 26 populations

QCM 5

Le projet génome humain :

- A. Est aujourd'hui à son terme
- B. A permis d'identifier les gènes impliqués dans de nombreuses maladies génétiques
- C. Permet aujourd'hui de rechercher les gènes impliqués dans les maladies multifactorielles
- D. A démontré la grande variabilité du génome humain
- E. Ouvre des perspectives pour découvrir des mécanismes de régulation de l'expression des gènes à l'échelle du génome



e-figure 3.8

Variants de nombre de copies (CNV, pour *copy number variation*).

La partie supérieure montre l'appariement des deux copies d'une même région localisée sur deux chromosomes homologues. Les deux duplications segmentaires situées sur chaque chromosome sont indiquées (rectangles blancs marqués DS1 et DS2 sur un chromosome, DS1' et DS2' sur l'autre). La recombinaison homologue entre les DS peut résulter soit en la délétion soit en la duplication du segment chromosomique situé entre les DS (figuré par la boîte hachurée). La recombinaison produit des DS hybrides DS1'/2 et DS2'/1'.

QROC 1

Expliquez comment le séquençage du génome a été rendu possible à partir des cartes génétique et physique du génome.

ADN codant et non codant dans le génome humain**QCM 1**

Structure d'un gène. Un gène comprend :

- A. Des exons
- B. Des protéines
- C. Des introns
- D. Des séquences régulatrices
- E. Des ribosomes

QCM 2

Les gènes :

- A. Codent tous pour des protéines
- B. Leur expression peut être régulée par des éléments régulateurs localisés à plus d'un million de paires de bases des séquences transcrites du gène
- C. Les éléments régulant l'expression peuvent se situer dans les introns
- D. Les éléments régulant l'expression peuvent se situer en aval du gène
- E. Tous les exons des gènes codant pour des protéines sont codants

QCM 3

Les ARN non codants :

- A. Les snoRNA ont pour rôle de modifier les ARN ribosomiques
- B. Certains interviennent dans l'épissage des gènes
- C. Correspondent aux introns une fois épissés
- D. Certains ont pour rôle de dégrader des ARN
- E. Les micro-ARN sont des régulateurs négatifs de l'expression de leurs gènes cibles

QCM 4

Transcription du génome :

- A. 10 % du génome est transcrit en ARN
- B. 70 % du génome est transcrit en ARN
- C. Des ARN non codants sont issus de certains *enhancers*
- D. 1 % du génome est contenu dans des exons
- E. Certains éléments répétés contenus dans le génome humain sont transcrits en ARN

QCM 5

Régulation à distance des gènes :

- A. Un *enhancer* n'est jamais localisé à plus de 10 kb du premier exon du gène
- B. Les HCNE ne sont pas impliqués dans la régulation de l'expression de gènes
- C. Des mutations dans des HCNE localisés à plusieurs centaines de kilobases de gènes peuvent être responsables de maladies génétiques

D. Les mutations responsables de maladies génétiques sont toujours localisées dans les exons

E. Une translocation peut provoquer la dérégulation de l'expression d'un gène

QCM 6

Régulation de l'expression des gènes à l'échelle du génome :

- A. Les éléments fonctionnels intervenant dans l'expression des gènes comprennent les sites de facteurs de transcription, les modifications chimiques des histones, les sites d'hypersensibilité à la DNase
- B. Des séquences séparées de plusieurs centaines de kilobases sur un même chromosome peuvent interagir physiquement
- C. Des séquences localisées sur des chromosomes différents ne peuvent pas interagir physiquement
- D. Chaque chromosome occupe dans le noyau un territoire spécifique
- E. Des anomalies structurales des chromosomes peuvent modifier le positionnement du chromosome dans le noyau et altérer l'expression de certains gènes

Polymorphisme du génome humain**QCM 1**

Les *single nucleotide variants* (SNV) :

- A. Comportent généralement deux allèles
- B. Ont une informativité toujours supérieure à 50 %
- C. Sont présents en moyenne tous les 50 000 nucléotides
- D. Sont au nombre de plusieurs millions sur notre génome
- E. Sont tous des RFLP

QCM 2

Les *single nucleotide variants* (SNV) :

- A. Sont les marqueurs ayant servi à construire la carte génétique du génome humain
- B. Servent pour réaliser des études d'association permettant d'identifier les gènes de prédisposition aux maladies multifactorielles
- C. Sont la plupart du temps pathogènes
- D. Sont appelés des polymorphismes SNP lorsqu'ils sont *a priori* sans effet notable sur le phénotype
- E. Sont appelés des mutations lorsqu'ils sont pathogènes

QCM 3

Les RFLP :

- A. Sont des SNV
- B. Sont généralement bialléliques
- C. Sont des mutations
- D. Sont les premiers polymorphismes de l'ADN à avoir été découverts
- E. Sont toujours localisés dans des gènes

QCM 4

Les microsatellites :

- A. Sont des polymorphismes pluri-alléliques
- B. Ont une informativité inférieure à 50 %
- C. Sont aisément génotypés par PCR
- D. Sont constitués de courtes séquences répétées en tandem
- E. Sont constitués d'éléments répétés de 20 à 100 pb

QCM 5

Les variants de nombre de copies (CNV) :

- A. Couvrent 5 à 10 % du génome humain
- B. Couvrent 20 à 30 % du génome humain
- C. Sont d'une taille restreinte à 10 kb

- D. Peuvent s'étendre sur plusieurs centaines ou milliers de kb et comporter plusieurs gènes
- E. Sont toujours pathogènes

QCM 6

Les variants de structure :

- A. Expliquent que certains segments chromosomiques sont présents à plus de deux copies dans le génome
- B. Sont des polymorphismes trouvés dans la population générale
- C. Sont des délétions, des duplications ou des inversions de segments chromosomiques
- D. Sont des mutations ponctuelles
- E. Sont liés à l'existence de séquences homologues appelées duplications segmentaires

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 3.2

Construction de la carte physique.



e-figure 3.3

Cartographie HapMap.



e-figure 3.5

Régulation de l'expression des gènes par des *enhancers* localisés à distance des séquences transcrites.



e-figure 3.6

Polymorphisme de type RFLP (pour *restriction fragment length polymorphism*).



e-figure 3.7

Microsatellites.



e-figure 3.8

Variants de nombre de copies (CNV, pour *copy number variation*).



Partie

Génétique formelle

PLAN DE LA PARTIE

Hérédité monogénique et mosaïcisme	41
Génétique des populations	49

This page intentionally left blank

Hérédité monogénique et mosaïcisme

Dominique Bonneau

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	42
Généralités	42
Hérédité autosomique dominante	42
Hérédité autosomique récessive	44
Hérédité liée au chromosome X	45
Mosaïcisme	47

Introduction

Ce chapitre va aborder les différents modes de transmission mendéliens : transmission autosomique dominante, transmission autosomique récessive et transmissions liées aux gonosomes. Ce chapitre n'abordera pas les modes d'hérédité complexe comme l'hérédité mitochondriale ou encore l'empreinte génomique parentale qui seront abordés dans les chapitres 20 et 21.

Généralités

Définition

Les termes d'hérédité monogénique, d'hérédité monofactorielle ou d'hérédité mendélienne sont employés indifféremment pour caractériser la transmission des maladies génétiques en relation avec des mutations dans un seul gène.

Notions fondamentales

Le noyau des cellules somatiques humaines comporte 46 chromosomes (23 chromosomes d'origine paternelle et 23 d'origine maternelle).

- Les **autosomes** sont les 22 paires de chromosomes identiques dans les deux sexes. Les chromosomes X et Y sont appelés **gonosomes** ou chromosomes sexuels.
- Le **gène** est l'unité d'information génétique. Le site physique où se situe un gène sur le chromosome est dénommé **locus**.
- Les **allèles** sont les différentes formes que peut prendre un même gène, à un locus donné.
- Les allèles diffèrent entre eux par variation de séquence. Certaines de ces variations entraînent un dysfonctionnement du gène : ce sont des **mutations**. D'autres variations n'ont pas de conséquence sur le fonctionnement du gène : ce sont des **polymorphismes**.

Quand un allèle du gène porte une variation de séquence pathologique, on parle d'**allèle morbide** par opposition aux **allèles sauvages** qui n'en portent pas.

- Un individu ayant deux allèles identiques à un locus donné est dit **homozygote**.
- Un individu ayant deux allèles différents à un locus est dit **hétérozygote**.
- Le **génotype** décrit, au sens strict, la constitution génétique de la cellule ou de l'individu. Par simplification, ce terme désigne la configuration des allèles à un locus donné.

- Le **phénotype** désigne les caractères observés en génétique humaine. Il peut s'agir aussi bien d'un caractère non pathologique (ex. : groupes sanguins, groupes tissulaires HLA) que d'une maladie.
- Une maladie **congénitale** est présente à la naissance; elle peut être génétique ou non (ex. : le virus de la rubéole peut être à l'origine d'anomalies congénitales). À l'inverse, beaucoup de maladies génétiques ne sont pas congénitales et ne s'expriment qu'au cours de la vie; on estime, en effet, que 10 % des maladies monogéniques ne sont découvertes qu'à l'âge adulte.

La dominance et la récessivité des allèles

Les notions de dominance et de récessivité sont fondamentales pour comprendre l'hérédité monogénique; elles définissent les relations entre les deux allèles situés au même locus sur des chromosomes homologues.

- L'allèle A est dit **dominant** sur l'allèle B si les phénotypes associés au génotype homozygote AA et hétérozygote AB sont identiques; l'allèle B est dit alors **récessif**.
- Si le phénotype d'un sujet AB est intermédiaire entre ceux résultant de AA et de BB, les allèles A et B sont dits **semi-dominants**.
- Si le sujet AB exprime à la fois ce qui est observé pour le génotype AA et pour celui BB, les deux allèles sont dits **codominants** (c'est le cas des groupes sanguins A et B).

L'arbre généalogique

La construction de l'arbre généalogique utilise les symboles internationaux représentés sur la [figure 4.1](#).

Hérédité autosomique dominante

Définition

Les gènes responsables des maladies transmises sur le mode autosomique dominant (AD) sont localisés sur les autosomes.

L'allèle porteur de la mutation responsable de la maladie est dominant sur l'allèle sauvage : **la maladie s'exprime chez les hétérozygotes**.

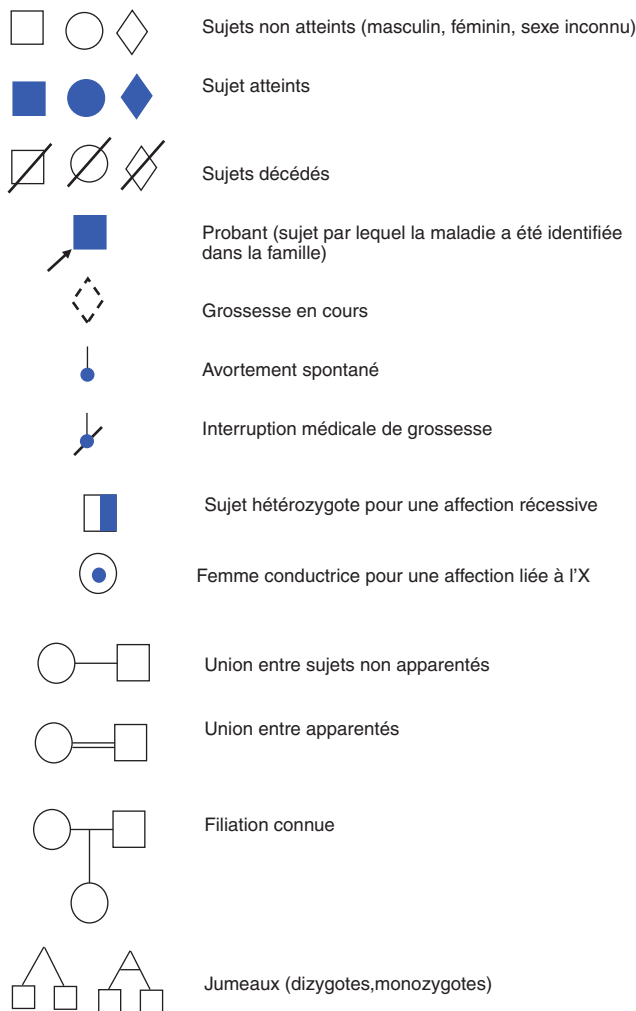


Figure 4.1

Principaux symboles utilisés pour la réalisation d'un arbre généalogique.

En pathologie humaine, les situations où l'on observe des homozygotes pour des mutations dominantes (c'est-à-dire la présence d'une mutation dominante sur chacun des deux allèles) sont très rares; cette situation peut conduire à un phénotype identique ou plus sévère.

Caractéristiques généalogiques des maladies AD

- Les deux sexes sont atteints avec la même fréquence.
- La transmission de la maladie peut se faire aussi bien par les hommes que par les femmes.
- Une transmission père-fils est pathognomonique de l'hérédité AD.

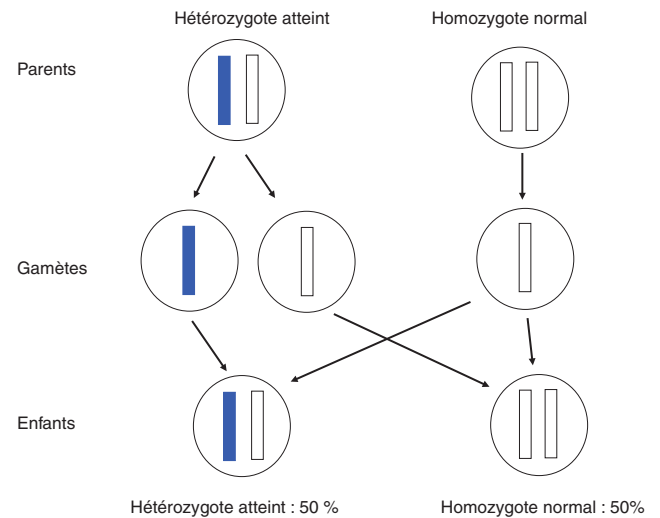


Figure 4.2

Représentation schématique de la transmission d'une maladie autosomique dominante (l'allèle morbide est en bleu).

- Toute personne porteuse d'un allèle morbide AD a un risque de 50 % (1/2) de le transmettre à ses enfants quel que soit leur sexe (figure 4.2).
- Les personnes atteintes se retrouvent sur plusieurs générations et leur répartition apparaît verticale sur l'arbre généalogique.

Exemples de maladie AD

- Hypercholestérolémie familiale : maladie due à des mutations du gène codant pour le récepteur du LDL cholestérol (19p13)
- Achondroplasie : nanisme dû à une mutation dans le gène FGFR3 (4p16.3).
- Maladie de Marfan : affection touchant notamment le squelette, l'œil, les gros vaisseaux et due à des mutations dans le gène codant pour la fibrilline 1 (15q21).
- Maladie de Huntington : maladie neurologique dégénérative de l'adulte causée par une mutation instable dans le gène codant pour la huntingtine (4p16).
- Ostéogenèse imparfaite : maladie avec fragilité osseuse due à une anomalie des gènes codant pour le collagène de type I.
- Neurofibromatose de type I (NF1) : maladie pouvant associer de façon très variable des signes cutanés, des tumeurs nerveuses, des signes osseux, des difficultés d'apprentissage et due à des mutations dans le gène NF1 (17q11).
- Certaines prédispositions pour les cancers se transmettent comme des caractères dominants; c'est le cas, par exemple, de 10 % des cancers du sein (gènes *BRCA1* et

BRCA2), de certains cancers du côlon (syndrome de Lynch), des formes familiales de cancers médullaires de la thyroïde (gène *RET*) et des formes familiales de rétinoblastome (cancer de la rétine de l'enfant) (gène *RB*).

Particularités de l'hérédité AD

Pénétrance incomplète

- Dans certaines maladies, les individus porteurs de la mutation peuvent ne présenter aucun signe de l'affection; on parle alors de pénétrance incomplète du gène morbide. Dans ce cas, un sujet apparemment sain peut être porteur du gène muté et transmettre la maladie à sa descendance.
- La pénétrance d'un allèle morbide est définie par le rapport suivant : nombre d'hétérozygotes malades/nombre total d'hétérozygotes.
- En pratique, une pénétrance de 80 % signifie qu'un sujet porteur de la mutation à 80 % de risque d'être malade.
- Ce phénomène est expliqué par l'interaction de l'allèle morbide avec des gènes modificateurs et/ou des facteurs de l'environnement.
- La pénétrance d'un gène peut aussi varier en fonction d'autres paramètres : l'âge (par ex. : la pénétrance du gène responsable de la chorée de Huntington est de 0 % à la naissance, de 50 % vers 40 ans et de 100 % vers 70 ans) ou le sexe.

Expressivité variable

Un allèle morbide peut s'exprimer par des signes cliniques différents d'un individu à l'autre. C'est le cas, par exemple, de la neurofibromatose de type I dont les signes cliniques peuvent varier chez les membres d'une même famille.

Néomutations ou mutations *de novo*

Il arrive qu'un sujet malade naisse de deux parents non porteurs de la mutation.

Ce phénomène est expliqué par l'apparition de l'allèle muté dans l'un des gamètes parentaux; il s'agit d'une mutation *de novo* ou néomutation. Dans la descendance du sujet porteur de cette nouvelle mutation, on retrouve les caractéristiques de transmission de l'hérédité AD. Pour certaines maladies, la proportion de néomutations est très élevée; c'est le cas, par exemple, de l'achondroplasie (80 %), de la NF1 (50 %) et de la maladie de Marfan (50 %). Ces néomutations sont favorisées par l'âge paternel élevé.

Mécanismes de la dominance

Mutations avec perte de fonction ou haplo-insuffisance

Un seul allèle fonctionne sur les deux, la quantité de protéine est insuffisante pour assurer une fonction normale.

Exemple : dans l'hypercholestérolémie familiale, la présence de la moitié des récepteurs LDL n'est pas suffisante pour maintenir un taux normal de LDL cholestérol circulant.

Mutation avec gain de fonction

Dans ce type de mutation, la protéine issue de l'allèle muté fonctionne différemment de la protéine physiologique. Cette fonction peut être amplifiée, dérégulée, toxique pour la cellule ou encore complètement nouvelle.

Mutation dominante négative

Dans ce type de mutation, le produit de l'allèle muté interfère avec la fonction de la protéine normale.

C'est par exemple le cas dans l'ostéogenèse imparfaite où la formation du collagène de type I, qui est une protéine multimérique (assemblage de trois molécules de collagène), est fragilisée par la présence d'une molécule de collagène anormale.

Hérédité autosomique récessive

Définition

Les gènes responsables des maladies transmises sur le mode autosomique récessif (AR) sont localisés sur les autosomes.

L'allèle muté responsable de la maladie est récessif sur l'allèle sauvage; les hétérozygotes sont sains et la maladie ne s'exprime que chez les homozygotes.

Caractéristiques généalogiques des maladies AR

- Les deux sexes sont atteints avec une fréquence égale.
- Les deux parents sont en général sains, mais sont obligatoirement hétérozygotes.
- Dans les familles, les sujets atteints se retrouvent le plus souvent dans la même fratrie donnant une répartition horizontale sur l'arbre généalogique.

Risque de récurrence

Un couple d'hétérozygotes a un risque de 25 % (1/4) d'avoir un enfant atteint à chaque nouvelle conception (figure 4.3).

Exemples de maladie AR

- La mucoviscidose est la maladie AR la plus fréquente en Europe. Elle est due à des mutations dans le gène *CFTR* (7q31).
- La drépanocytose et les thalassémies sont des pathologies génétiques AR de l'hémoglobine. Les mutations sont situées au niveau des gènes codant pour les chaînes α ou β de la globine.
- La plupart des maladies héréditaires du métabolisme, dues à des anomalies enzymatiques, se transmettent sur le mode AR (ex. : la phénylcétonurie [12q24]).

Particularités de l'hérédité AR

La consanguinité

La proportion d'unions consanguines est plus élevée dans l'ascendance des sujets atteints de maladies AR.

On parle d'union consanguine quand les deux membres d'un couple ont au moins un ancêtre commun. Dans cette situation, l'homme et la femme ont un risque plus grand d'avoir reçu de leur ancêtre commun un allèle identique à un locus donné et d'avoir des enfants homozygotes pour cet allèle.

Le coefficient de consanguinité définit la probabilité que les enfants de cette union soient homozygotes à un locus donné. Par exemple, pour un couple de cousins germains, ce coefficient est de 1/16.

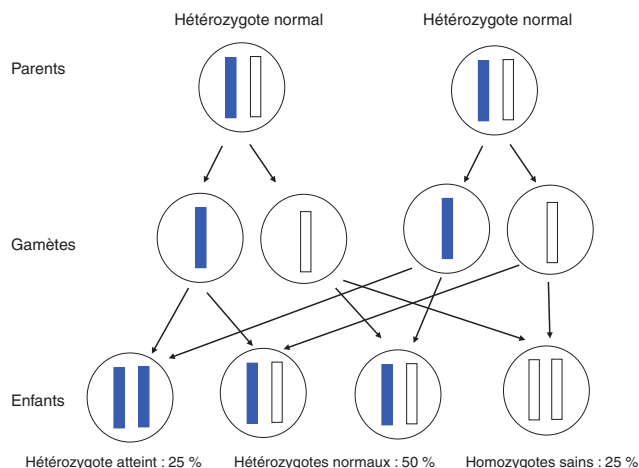


Figure 4.3

Représentation schématique de la transmission d'une maladie autosomique récessive (l'allèle morbide est en bleu).

L'hétérogénéité génétique

L'hétérogénéité génétique intéresse tous les modes de transmission mais est particulièrement illustrée par les maladies AR.

On distingue :

- **L'hétérogénéité allélique ou intralocus**, qui rend compte du fait qu'une maladie peut être due à des mutations différentes (alléliques) dans le même gène (une maladie/plusieurs allèles morbides). C'est ainsi que l'on connaît actuellement plus de 1000 mutations différentes du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose. Un individu malade portant deux mutations différentes au même locus est appelé **hétérozygote composite**;
- **L'hétérogénéité interlocus** se traduit par le fait qu'un phénotype apparemment identique peut être produit par des mutations dans des gènes différents (une maladie/plusieurs gènes). Par exemple, on a actuellement identifié plus de 150 gènes impliqués dans les rétinites pigmentaires (AD, AR et RLX) qui sont des affections dégénératives de la rétine.

Hérédité liée au chromosome X

Les maladies dont le gène est localisé sur le chromosome X se transmettent le plus souvent sur le mode récessif lié à l'X; certaines sont transmises sur le mode dominant lié à l'X.

Hérédité récessive liée à l'X (RLX)

Définition

Dans ce mode d'hérédité, l'allèle morbide se comporte comme un caractère récessif.

Les femmes hétérozygotes ne sont pas atteintes mais peuvent transmettre la maladie; elles sont dites **conductrices** de la maladie.

La maladie ne se manifeste que chez les sujets de sexe masculin (XY) ne possédant qu'une seule copie du gène (sujets **hémizyotes**).

Caractéristiques généalogiques des maladies RLX

- Seuls les garçons sont atteints.
- Dans les formes familiales, les sujets mâles atteints se retrouvent uniquement dans la lignée maternelle.
- Il n'y a aucun sujet atteint dans la lignée paternelle et l'on n'observe jamais de transmission père-fils.

Risques de récurrence (figure 4.4)

Les risques pour une femme conductrice sont les suivants :

- un garçon sur deux est atteint;
- une fille sur deux est conductrice.

Si un homme atteint se reproduit, aucun de ses enfants n'est malade, mais toutes ses filles sont conductrices.

Exemples de maladie RLX

- Dystrophie musculaire de Duchenne : maladie musculaire entraînant une atteinte progressive de pratiquement tous les muscles (gène *DMD* codant pour la dystrophine, Xp21).
- Hémophilie A : maladie due à la diminution ou à l'absence du facteur VIII de la coagulation (Xq27).
- Hémophilie B : diminution ou absence du facteur IX de la coagulation (Xq27).
- Daltonisme : anomalie de la vision des couleurs (Xq27).
- Déficit en G6PD : déficit enzymatique en glucose-6-phosphate déshydrogénase qui est une enzyme du globe rouge (Xq27).

Particularités de l'hérédité RLX

Inactivation de l'X

Dans chacune des cellules somatiques féminines, les allèles d'un seul chromosome X sont fonctionnels; ceux portés par l'autre chromosome X sont pratiquement tous inactivés.

L'inactivation d'un des chromosomes X se fait au hasard, à un stade précoce de l'embryogenèse.

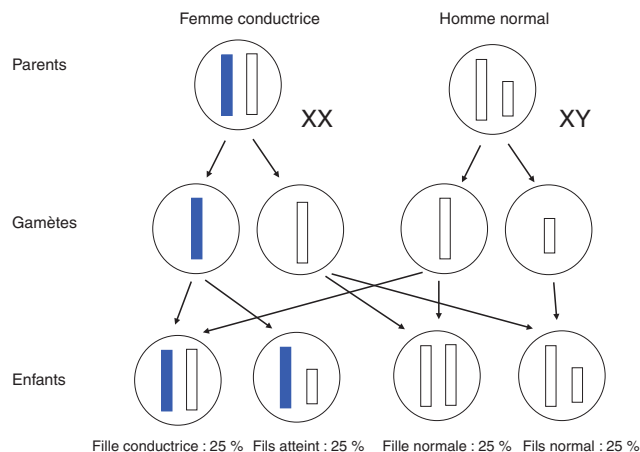


Figure 4.4

Représentation schématique de la transmission d'une maladie récessive liée à l'X (le chromosome X portant l'allèle morbide est en bleu).

Chez une femme hétérozygote pour une maladie RLX, l'inactivation peut toucher soit le chromosome porteur de l'allèle muté, soit celui porteur de l'allèle sain.

La répartition aléatoire des X actifs dans tous les tissus explique la variabilité d'expression de l'allèle muté qui peut entraîner des anomalies biologiques, voire cliniques, chez les conductrices.

Détection des femmes conductrices (hétérozygotes)

Dans une famille touchée par une maladie RLX, le dépistage des conductrices est essentiel en raison du risque de transmission et des possibilités éventuelles de diagnostic prénatal.

Cette détection peut se faire :

- en recherchant des signes cliniques ou biologiques mineurs de l'affection en cause (ex. : dosage des enzymes musculaires dans la dystrophie musculaire de Duchenne ou dosage de l'activité du facteur VIII dans l'hémophilie A). Ce type de détection n'est possible que pour certaines maladies et toutes les conductrices n'expriment pas d'anomalie;
- par la biologie moléculaire quand le gène ou sa localisation sont connus.

Mutations de novo

Comme pour les maladies dominantes, une mutation sur le chromosome X peut survenir au cours de la méiose d'un individu totalement sain et non porteur de la mutation.

Une mutation survenue au cours de la méiose masculine peut donner naissance à une fille conductrice.

Une mutation survenue au cours de la méiose féminine peut donner soit une fille conductrice soit un garçon atteint.

Hérédité dominante liée à l'X (DLX)

Définition

Dans la transmission DLX, l'allèle morbide se comporte comme un caractère dominant et se manifeste aussi bien chez les garçons hémizygotés que chez les filles hétérozygotes (souvent à un degré de gravité moindre).

Caractéristiques généalogiques des maladies DLX et risque de récurrence (figure 4.5)

- Les deux sexes peuvent être touchés par la maladie.
- En général, les filles hétérozygotes sont moins sévèrement malades que les garçons.

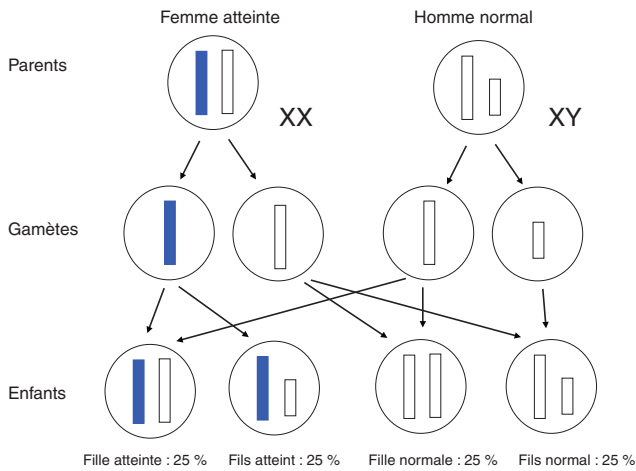


Figure 4.5

Représentation schématique de la transmission d'une maladie dominante liée à l'X (le chromosome X porteur de l'allèle morbide est en bleu).

- Les femmes atteintes peuvent transmettre leur maladie aux enfants des deux sexes avec un risque de 1/2.
- Dans la descendance d'un homme atteint, toutes les filles reçoivent le gène muté; en revanche, il n'y a jamais de garçon atteint (pas de transmission père-fils).
- Comme pour l'hérédité AD, la pénétrance peut être incomplète et l'expressivité peut varier.

Exemples de maladies DLX

- Syndrome de l'X fragile : cause très fréquente de déficience intellectuelle (gène *FMR1*, Xq27.3). Le type de mutation en cause dans cette maladie est très particulier : il s'agit d'une mutation par expansion de trinuécléotides, dite « mutation instable ».
- Rachitisme vitaminorésistant hypophosphatémique par anomalie du récepteur de la vitamine D (Xq22).
- Déficit en ornithine transcarbamylase (OTC) (déficit enzymatique sur le cycle de l'urée) (Xp11).

Mosaïcisme

Le mosaïcisme est défini par la présence chez un individu de deux lignées cellulaires différentes :

- une lignée normale;
- une lignée porteuse d'un génotype différent en raison de la présence soit d'une mutation génique, soit d'une anomalie chromosomique.

Ces anomalies du génotype surviennent au cours d'une **division mitotique** après la fécondation. Elles se

retrouvent dans le clone de cellules filles issu de la cellule où s'est initialement produite l'anomalie (**répartition clonale**) mais pas dans les autres cellules. Plus la mutation ou l'anomalie chromosomique survient tôt au cours du développement embryonnaire, plus la proportion de cellules anormales est grande.

Ce type d'anomalies mitotiques peut également survenir tout au long de la vie lors de la division d'une cellule dans un organe.

Lorsque le mosaïcisme touche les cellules du corps (soma), on parle de **mosaïque somatique**; lorsque le mosaïcisme touche les cellules germinales (spermatozoïdes et ovocytes), on parle de **mosaïque germinale**.

Dans la plupart des cas, la présence d'un clone cellulaire porteur d'un génotype anormal n'a pas de conséquence clinique. Cependant, on peut distinguer trois circonstances où le mosaïcisme peut être à l'origine de pathologies :

- quand la mutation somatique dans un gène confère à la cellule un avantage prolifératif sur les cellules normales. C'est ce qui se passe dans l'apparition des cancers (voir [chapitre 23, «Oncogénétique»](#));
- quand la mutation ou l'anomalie chromosomique apparaît très tôt dans le développement embryonnaire et que le clone anormal interfère avec le développement normal. C'est le cas, par exemple, des trisomies 21 en mosaïque où le phénotype peut être indiscernable de celui d'une trisomie 21 classique (voir [chapitre 28, «Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie chromosomique : la trisomie 21»](#)). L'autre exemple est celui du syndrome de Protée ou des mutations somatiques du gène *AKT1* peuvent entraîner des anomalies squelettiques et mésenchymateuses majeures;
- quand le mosaïcisme germinale peut entraîner la récurrence d'une pathologie dominante ou liée à l'X que l'on croyait due à une mutation *de novo*.

Le mosaïcisme germinale est une source très importante d'incertitude pour le conseil génétique. Un individu sans aucun signe clinique peut avoir plusieurs enfants atteints d'une pathologie dominante ou liée à l'X alors que la mutation en cause est indétectable au niveau de son sang. Dans ce cas, la mutation est présente au niveau d'une fraction de ses cellules gonadiques et peut être transmise à nouveau. Le risque de récurrence est difficile à évaluer car il dépend de la proportion, *a priori* impossible à connaître, de cellules anormales dans la mosaïque.

Le mosaïcisme germinale a été décrit dans beaucoup de maladies dominantes (ex. : la NF1 ou l'ostéogénèse imparfaite) ou liées au chromosome X (ex. : la dystrophie musculaire de Duchenne).

ENTRAÎNEMENT 4 QCM

QCM 1

Concernant la transmission autosomique, quelles affirmations sont vraies ?

- A. La transmission est de type horizontal
- B. Le risque de récurrence est de 50 % si un des parents est atteint
- C. Seuls les garçons sont malades
- D. Un patient muté peut ne présenter aucun signe clinique
- E. Un patient atteint aura forcément tous ses enfants atteints

QCM 2

Un garçon est atteint d'une myopathie de Becker :

- A. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante
- B. Sa mère a une forte probabilité d'être conductrice
- C. Tous ses frères auront également une myopathie de Becker
- D. Le fait que les parents de ce garçon soient cousins germains a eu une incidence sur l'apparition de la maladie
- E. Si ce garçon a des enfants, toutes ses filles seront conductrices

Génétique des populations

Nicole Philip

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	50
Fréquences alléliques et estimation de leurs proportions à partir des génotypes	50
La loi de Hardy-Weinberg	50
Facteurs influençant les fréquences géniques – Déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg	52
Causes du maintien des maladies génétiques malgré la sélection dans les grandes populations	53
Fréquence élevée de certaines maladies très rares dans de petites populations : l'effet fondateur	55
Consanguinité	55

Introduction

La génétique des populations, appliquée à la génétique médicale, a pour objectif l'étude de la distribution et des changements de la fréquence des versions d'un gène (allèles) chez l'homme et des facteurs susceptibles de modifier ces fréquences au cours des générations successives. Certains de ces facteurs, comme la sélection, les mutations, la dérive génétique et les migrations peuvent changer la fréquence des allèles et des génotypes. La consanguinité (union entre sujets apparentés) peut modifier la fréquence des génotypes sans influencer la fréquence des allèles.

La loi de Hardy-Weinberg décrit les relations entre les fréquences génotypiques et les fréquences alléliques. Elle permet l'estimation de la fréquence des hétérozygotes pour les maladies récessives autosomiques.

Fréquences alléliques et estimation de leurs proportions à partir des génotypes

Pour parler de fréquences alléliques, on se réfère à la notion de *pool* d'allèles pour un gène donné d'une population. Pour un gène autosomique, dans une population de N individus, il y a 2N locus.

Si l'on considère un locus avec deux allèles A et a, p définit la proportion d'allèles A et q la proportion d'allèles a.

L'estimation de la fréquence des allèles à partir des génotypes n'est possible que si tous les génotypes sont identifiants : les deux allèles sont codominants.

La meilleure estimation de la fréquence de ces allèles est :

$$p = f(AA) + 1/2 f(Aa)$$

$$q = f(aa) + 1/2 f(Aa)$$

(avec $f(xx)$ = fréquence du génotype xx)

La loi de Hardy-Weinberg

Proposée en 1908 indépendamment par le mathématicien anglais Hardy et le médecin allemand Weinberg, la loi de Hardy-Weinberg se définit comme suit : dans une population de dimension infinie, où les unions se font au hasard (panmixie), où il n'existe ni migration, ni sélection contre un phénotype particulier et où le taux de mutations est constant, les proportions des différents génotypes restent constantes d'une génération à l'autre.

Prenons l'exemple d'un locus qui peut être occupé par deux allèles A et a, tels que la proportion de gènes A est p et la proportion de gènes a est q :

$$p + q = 1$$

(q est en général utilisé pour désigner l'allèle récessif.)

		Gamètes mâles	
		A (p)	a (q)
Gamètes femelles	A (p)	AA (p^2)	Aa (pq)
	a (q)	Aa (pq)	aa (q^2)

- Fréquence du génotype **AA : p^2**
- Fréquence du génotype **aa : q^2**
- Fréquence du génotype **Aa : $2pq$**

$$f(A) = p^2 + 2pq/2 = p(p + q) = p$$

$$f(a) = q^2 + 2pq/2 = q(p + q) = q$$

Dans une population telle que définie précédemment, nous allons voir comment évolue la fréquence des gènes d'une génération à l'autre :

Unions possibles	AA	Aa	aa
AA	p^4	$2p^3q$	p^2q^2
Aa	$2p^3q$	$4p^2q^2$	$2pq^3$
aa	p^2q^2	$2pq^3$	q^4

$$\text{Fréquence des mariages } aa \times Aa = 2pq^3 + 2pq^3 = 4pq^3$$

Type d'union	fréquence	Génotypes des enfants		
		AA	Aa	aa
AA X AA	p^4	p^4		
AA X Aa	$4p^3q$	$2p^3q$	$2p^3q$	
Aa X Aa	$4p^2q^2$	p^2q^2	$2p^2q^2$	p^2q^2
aa X aa	q^4			q^4
aa X Aa	$4pq^3$		$2pq^3$	$2pq^3$
AA x aa	$2p^2q^2$		$2p^2q^2$	

Total :

$$AA : p^2 (p^4 + 2p^3q + p^2q^2) = p^2 (p^2 + 2pq + q^2) = p^2$$

$$Aa : 2pq (p^4 + 2p^3q + p^2q^2) = 2pq (p^2 + 2pq + q^2) = 2pq$$

$$Aa : q^2 (p^4 + 2p^3q + p^2q^2) = q^2 (p^2 + 2pq + q^2) = q^2$$

La proportion des génotypes reste donc inchangée à la deuxième génération, c'est l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Application de la loi de Hardy-Weinberg à l'estimation des fréquences des allèles de gènes autosomiques

Si les hétérozygotes ne sont pas reconnaissables (dominance complète d'un allèle), dans l'hypothèse où les génotypes sont en équilibre, les fréquences alléliques et les fréquences de génotypes peuvent être estimées si la fréquence de l'homozygote rare est connue.

Supposons une maladie récessive liée à des mutations homozygotes d'un gène biallélique, A représentant l'allèle normal et a l'allèle muté.

Le phénotype des individus présentant les génotypes AA et Aa est identique.

Par contre, la proportion d'individus aa malades est connue et correspond à q^2 .

On peut donc en déduire la fréquence de l'allèle a : $q = \sqrt{q^2}$, puis celle de l'allèle p puisque $p = 1 - q$.

La fréquence des hétérozygotes Aa correspondant à $2pq$ peut en être déduite :

$$2pq = 2 \times \sqrt{q^2} \times (1 - \sqrt{q^2})$$

Si q est très petit, $1 - \sqrt{q^2}$ est très proche de 1, donc $2pq \sim 2\sqrt{q^2}$

Exemple : la phénylcétonurie est une maladie récessive autosomique qui atteint un enfant sur 10 000.

$$q = \sqrt{1/10\,000} = 1/100$$

$$2pq = 2 \times 1/100 \times (1 - 1/100)$$

$1 - 1/100 = 99/100$: très peu différent de 1 ; donc $2pq \sim 2 \times 1/100 \sim 1/50$

Pour les maladies liées au chromosome X

La situation est plus simple. Les hommes ne possédant qu'un seul chromosome X, la fréquence de l'allèle morbide est égale à la proportion de garçons qui sont atteints.

Maladie récessive liée au chromosome X					
	Garçons		Filles		
Phénotype	Sain	Malade	Sain	Saine	(Malade)
Génotype	A	a (l)	AA	Aa (H)	aa
Fréquence	p	q	p^2	$2pq$	q^2

On connaît l, l'incidence de la maladie dans la population masculine : $l = q$

La fréquence des filles hétérozygotes, H est donc égale à : $2 \times q \times (1 - q)$

Si q est très petit : $H = 2 \times l$ (il y a deux fois plus de femmes hétérozygotes que de garçons atteints).

Pour vérifier si la loi de Hardy-Weinberg s'applique à une population donnée pour un gène donné

On calcule les fréquences alléliques à partir des fréquences des génotypes

Population N $\rightarrow$ nombre d'allèles = 2N

Nombre d'individus AA = x

Nombre d'individus BB = y

Nombre d'individus AB = z

$$\text{Fréquence de l'allèle A : } p = \frac{2x + z}{2N}$$

$$\text{Fréquence de l'allèle B : } q = \frac{2y + z}{2N}$$

On compare les nombres attendus aux nombres observés

• Nombres attendus :

$$AA = p^2 \times N$$

$$BB = q^2 \times N$$

$$AB = 2pq \times N$$

• Nombres observés : fréquence des génotypes observés.

On fait un test de χ^2 .

Exemple¹ : les auteurs ont étudié la fréquence des différents génotypes dans trois gènes dans deux groupes de population (95 Afro-Américains [AA], et 95 Américains d'origine européenne [EA]).

1. Issu de Lanfear DE, Marsh S, Cresci S, Shannon WD, Spertus JA, McLeod HL. Genotypes associated with myocardial infarction risk are more common in African Americans than in European Americans. J Am Coll Cardiol 2004; 44 : 165–7.

Polymorphisme	GJA-4 (C10009T)			MMP-3 (-1171delA)			PAI-1 -668delG		
Génotype	C/C	C/T	T/T	-/-	-/A	A/A	-/-	-/G	G/G
AA nombre (%)	24 (25,3)	52 (54,9)	19 (19,8)	2 (2,2)	19 (19,8)	74 (78)	7 (7,6)	35 (37)	53 (55,4)
EA nombre (%)	46 (48,4)	42 (44,1)	7 (7,5)	30 (32,3)	42 (44,1)	23 (23,6)	37 (38,7)	44 (46,2)	14 (15,1)

Pour le polymorphisme GJA-4 (C10009T) : $x = 24$; $y = 19$; $z = 52$; $N = 95$

- Dans la population AA :

- fréquence de l'allèle C :

$$p = \frac{(24 \times 2) + 52}{95 \times 2} = \frac{100}{190} = 0,526$$

- fréquence de l'allèle T : $\frac{(19 \times 2) + 52}{95 \times 2} = \frac{100}{190} = 0,474$

- nombres observés :

- nombres attendus :

- génotype C/C : $(0,526)^2 \times 95 = 26,2$

- génotype C/T : $2 \times 0,526 \times 0,474 \times 95 = 47,3$

- génotype T/T : $(0,474)^2 \times 95 = 21,3$

(p entre 0,3 et 0,5 : non significatif)

$$\chi^2 : \frac{\sum(o - e)^2}{e} = \frac{(24 - 26,2)^2}{26,2} + \frac{(52 - 47,3)^2}{47,3} + \frac{(19 - 21,3)^2}{21,3} = 0,185 + 0,47 + 0,25 = 0,9$$

Avec o = nombre observé

e = nombre attendu

Le seuil de signification à 5 % du χ^2 , pour 1 ddl, est à 3,84. La valeur du χ^2 obtenue étant inférieure à 3,84, l'hypothèse nulle, à savoir que la population étudiée suit la loi de Hardy-Weinberg, n'est pas rejetée.

Facteurs influençant les fréquences géniques – Déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg

Mutations

Les mutations non récurrentes

Si une mutation est unique ou très rare, la probabilité qu'elle disparaisse est très grande du fait des fluctuations d'échantillonnage.

Une mutation unique qui n'entraîne pas d'avantage sélectif pour le mutant ne peut pas produire d'effet permanent dans une population.

Les mutations récurrentes

Si une mutation est récurrente, on parle de pression de mutation.

Soit un gène A, avec deux allèles A1 et A2 de fréquence p_0 et q_0 à un instant t_0 :

	μ		ν	
	A1	> A2	A2	> A1
Fréquence	p_0	μp_0	q_0	νq_0

La fraction de A1 transformée en A2 par mutation sera de μp .

La fraction de A2 transformée en A1 par mutation sera de νq .

En fait ν est habituellement beaucoup moins fréquent que μ .

Donc, l'allèle A1 devrait tendre à diminuer au profit de A2. Pour maintenir l'équilibre, il y a donc un autre mécanisme, **la sélection**.

Sélection

On parle de sélection naturelle lorsque différents génotypes ne sont pas également viables et féconds.

À chaque génotype, on peut associer un coefficient **s** ou **coefficient de sélection** compris entre 0 et 1.

Dans **une maladie létale** ou génétiquement létale (les individus peuvent survivre mais ne se reproduisent pas) **s = 1**.

La **valeur adaptative (f)** d'un génotype est définie comme son efficacité à produire des descendants.

Cette valeur adaptative est mesurée en valeur relative, **1** symbolisant le f du génotype optimum : **s = 1 - f**.

Dérive génétique

Dans les grandes populations, les variations (liées au hasard) du nombre d'enfants produits par des individus

de génotypes différents n'ont pas d'effet significatif sur la fréquence des gènes.

Dans les **petites populations**, ces variations peuvent avoir un effet considérable :

- un allèle particulier n'est retrouvé que chez un petit nombre d'individus, si ces individus n'ont pas d'enfants ou que, par chance (hasard), ces enfants n'héritent pas de cet allèle, l'allèle en question va complètement disparaître de la population (éteint : fréquence = 0) et l'autre allèle va devenir fixé (fréquence = 1).

La part de la **dérive génique aléatoire** dépend de la taille de la population. Elle est plus grande dans les petites populations où les variations dans la fréquence des gènes peuvent être considérables d'une génération à l'autre.

Démonstration

Influence de la dérive aléatoire sur les fréquences géniques.

Soit N_e l'effectif de la population des reproducteurs. La nouvelle génération est formée à partir d'un échantillon de $2N_e$ gamètes.

Soient p et q la proportion des deux allèles à la première génération.

La loi de probabilité de p est une loi binomiale de variance.

$$V_p = \frac{pq}{2N_e} \text{ et } \sigma \text{ (écart-type)} = \text{racine carrée de } V_p$$

Exemple : $N_e = 50$ et $p = 0,5$

$$\sigma^2 = \frac{0,5 \times 0,5}{100} = \frac{1}{400} \rightarrow \sigma = \frac{1}{20} = 0,05$$

À la génération suivante, p sera compris entre 0,40 et 0,60 ($\pm$ deux écarts-types) avec une probabilité de 95 %.

À la génération suivante, si $N = 50$ et $p = 0,4$,

$$\sigma^2 = \frac{0,4 \times 0,6}{100} = \frac{0,24}{100} = \frac{1}{400} = 0,05$$

p sera compris entre 0,3 et 0,5.

Dans un tel système, il n'y a que 2 états stables : $p = 0$ et $p = 1$.

Sous l'influence de la dérive, une population évoluera vers l'un de ces deux états.

Dans une petite population, lorsqu'une mutation apporte un nouvel allèle, le destin ultime de celui-ci est :

$$\text{– soit de disparaître : probabilité} = 1n \frac{1}{2N_e}$$

$$\text{– soit d'éliminer les autres : probabilité} = \frac{1}{2N_e}$$

Dans une population de 500 individus, un nouvel allèle a 1 chance sur 1 000 d'éliminer les autres et 999 chances sur 1 000 d'être éliminé.

La durée moyenne est de :

- $2\log(2N)$ générations pour la disparition ;
- $4N$ générations pour la fixation.

Causes du maintien des maladies génétiques malgré la sélection dans les grandes populations

Dans les maladies génétiques soumises à la sélection, un nombre significatif d'allèles n'est pas transmis à la génération suivante et disparaît donc du « pool » d'allèles. Malgré ceci, les maladies génétiques se maintiennent à une fréquence stable dans la population. Deux phénomènes peuvent expliquer ceci : l'équilibre mutation-sélection et l'avantage sélectif des hétérozygotes.

L'équilibre mutation-sélection

À chaque génération, les mutations survenues *de novo* vont compenser la perte des allèles liés à la sélection :

- **pour des maladies dominantes génétiquement létales** (dans laquelle les individus ont une fertilité nulle quelle que soit la durée de leur vie), tous les cas sont liés à des mutations *de novo* (par exemple les chondrodysplasies létales comme le nanisme thanatophore, les encéphalopathies liées à des mutations de gènes comme *MEF2C*, *EHMT1*, etc.) ;
- **pour certaines maladies dominantes, la fertilité est diminuée** soit parce que les individus ont une durée de vie moyenne réduite (neurofibromatose), soit parce qu'en dépit d'une fécondité normale, ils ont moins d'enfants que la population générale (achondroplasie). Le pourcentage de cas lié à des mutations *de novo* est donc d'autant plus élevé que la fertilité des individus atteints est faible. On estime que 80 % des enfants atteints d'achondroplasie naissent de

parents normaux (NB : l'achondroplasie est une maladie à pénétrance complète).

- **pour les maladies récessives liées au chromosome X**, s'il s'agit d'une maladie génétiquement létale, $s = 1$ pour les individus atteints.

Comme nous avons vu que H (fréquence des femmes hétérozygotes) = $2I$ (incidence des individus malades), à chaque génération $1/3$ (les allèles des hommes atteints) du pool d'allèles mutés (allèles des hommes atteints + allèles des femmes hétérozygotes) est éliminé. Comme la plupart de ces maladies se maintiennent à une fréquence constante dans la population, ceci veut dire qu'à chaque génération, $1/3$ des cas sont liés à des mutations *de novo*. C'est le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Démonstration

H : fréquence des femmes hétérozygotes ;
 I : incidence des hommes malades ; μ : taux de mutations.

$$H = 2\mu + H/2 + I(1-s) \text{ ou } H = 2\mu + H/2 + If$$

$$I = \mu + H/2$$

Dans une maladie génétiquement létale : $s = 1$ et $f = 0$.

$$H = 2\mu + H/2 \text{ et } I = \mu + H/2$$

$$\text{D'où : } H = 4\mu \text{ et } I = \mu + 2\mu \rightarrow \mu = I/3$$

Dans certaines maladies liées au chromosome X (hémophilie, dystrophie musculaire de Becker), les hommes atteints ont une fertilité réduite mais peuvent avoir des enfants et transmettront donc la mutation à toutes leurs filles. La proportion de mutations *de novo* est donc inférieure et la mère d'un cas sporadique a plus de risque d'être hétérozygote.

Dans une maladie non létale, par exemple la dystrophie musculaire de Becker dans laquelle $f = 0,7$.

$$H = 2\mu + H/2 + I(0,7)$$

$$I = \mu + H/2$$

$$H = 2\mu + H/2 + (\mu + H/2)(0,7)$$

$$H/2 - 0,7 H/2 = 2,7\mu \text{ donc } 0,3 H/2 = 2,7\mu \text{ donc } H = 18\mu$$

$$\text{Comme } I = \mu + H/2 \text{ } I = 10\mu \text{ } \mu = I/10$$

- **pour les maladies récessives très rares, la sélection s'exerce à l'encontre des homozygotes** alors que l'immense majorité des allèles mutés sont portés par des individus hétérozygotes, ce qui permet le maintien des fréquences géniques. Dans une maladie de fréquence q^2 , le nombre d'allèles éliminés à chaque génération est $2q^2$ (chaque individu atteint ayant deux allèles) alors que $2pq$ (c'est-à-dire à peu près $2q$) sont transmis par les hétérozygotes à la génération suivantes. Si $q^2 = 1/90\,000$, la

proportion d'allèles éliminés est de $1/300$. On estime que le taux de mutations *de novo* est très faible (mais non nul).



Âge paternel et mutations

L'influence de l'âge paternel sur la survenue de mutations dominantes *de novo* est démontrée. Certaines mutations *de novo* ont une origine paternelle exclusive. Pour beaucoup d'entre elles, notamment celles conduisant à la neurofibromatose de type I, le syndrome d'Apert, l'achondroplasie, le nanisme thanatophore, le syndrome de Marfan, l'âge moyen des pères à la naissance est significativement plus élevé que l'âge paternel moyen dans la population générale. L'âge paternel avancé favorise aussi la survenue de certaines mutations sur des gènes liés au chromosome X. Dans certaines maladies (maladie de Lesch-Nyhan, hémophilie) l'origine des mutations est exclusivement paternelle (donc grand-paternelle pour le sujet atteint) et l'âge des grands-pères maternels à la naissance de leur fille hétérozygote était significativement plus élevé.

Cette influence a longtemps été attribuée au fait que, contrairement à la méiose féminine où le stock d'ovocytes est fixé à la naissance, les cellules-souches donnant naissance aux spermatozoïdes continuent à se diviser toute la vie, favorisant ainsi l'accumulation progressive d'erreurs de réplication dans les gonades masculines.

Des travaux récents ont montré que ceci était lié au fait que certaines mutations conféraient aux spermatogonies un avantage sélectif, favorisant la sélection clonale (cf. Goriely et al., 2003). Ceci a notamment été démontré pour les mutations des gènes *FGFR* (responsables de pathologies telles que les syndromes d'Apert et de Crouzon, l'achondroplasie, etc.), mutations retrouvées dans certains cancers.

L'avantage sélectif des hétérozygotes

Dans les maladies récessives fréquentes intervient un autre phénomène, l'avantage sélectif des hétérozygotes : les hétérozygotes ont une fertilité supérieure à celle des homozygotes normaux et transmettent donc à la génération suivante un excès d'allèles mutés, ce qui permet le maintien de la fréquence de la maladie malgré une sélection totale

contre les homozygotes. C'est le cas de la drépanocytose et du déficit en G6PD, deux maladies du globule rouge particulièrement répandues en Afrique, car les hétérozygotes sont résistants au paludisme, facteur majeur de mortalité dans ces régions. La même théorie a été avancée pour la mucoviscidose; les porteurs hétérozygotes de la mutation $\Delta F508$ auraient une résistance accrue au choléra et autres maladies infectieuses intestinales dont les épidémies ont décimé les populations jusqu'au Moyen Âge. Ceci est souvent appelé *overdominance* et ce phénomène permet de compenser la perte des gènes liée à l'infertilité des homozygotes.

Fréquence élevée de certaines maladies très rares dans de petites populations : l'effet fondateur

Lorsqu'une population est fondée à partir d'un petit groupe d'individus, si parmi les fondateurs se trouve un allèle très rare, celui-ci peut, sous l'influence de la dérive génétique (voir plus haut) et en l'espace de quelques générations, être fixé. On trouve plusieurs maladies récessives liées à un effet fondateur dans la population finlandaise. Dans la population Amish de Pennsylvanie, le syndrome d'Ellis-van Creveld est relativement fréquent ($q = 0,07$) alors qu'il est exceptionnel dans le reste du monde. Dans toutes les familles Amish étudiées, la mutation est la même et il a pu être démontré que toutes ces familles descendaient d'un même couple d'immigrants.

Consanguinité

Deux personnes sont apparentées lorsqu'ils ont au moins un ancêtre commun vérifiable. Les individus nés d'une union entre apparentés sont dits consanguins. Par extension, l'épithète peut concerner une union.

On peut définir le coefficient de consanguinité comme la probabilité que, chez un individu, en un locus autosomique donné, les **deux allèles soient identiques par descendance mendélienne**, c'est-à-dire qu'ils proviennent de la répllication d'un allèle que possédait un ancêtre commun à son père et à sa mère. L'individu consanguin, homozygote à un locus du fait de sa consanguinité, peut être dit « autozygote »; le coefficient de consanguinité est donc la probabilité qu'à un locus donné le sujet soit autozygote.

Calcul du coefficient de consanguinité

L'individu X, est issu d'un couple de cousins germains.

Soit le locus A. Les deux ancêtres communs sont porteurs respectivement des allèles A1 et A2 et A3 et A4.

Calculons la probabilité que l'individu X soit homozygote au locus A par répllication d'un de ces quatre allèles ancestraux. Pour chacun des quatre allèles, l'individu consanguin peut l'avoir reçu par son père ou par sa mère (figure 5.1).

Consanguinité et maladie récessive autosomique

À l'échelle d'un individu

Soit une maladie de fréquence q^2 (un individu pris au hasard dans la population générale a un risque q^2 d'être atteint de cette maladie).

Pour un individu consanguin (coefficient F) :

- la probabilité que cet individu soit homozygote du fait de sa consanguinité est Fq ;
- la probabilité qu'il soit homozygote du fait du hasard et de $(1-F)q^2$;
- le risque qu'il soit homozygote, au total est $Fq + (1-F)q^2$:
 - soit $= q^2 - Fq^2 + Fq$,
 - soit $= q^2 + Fq(1-q)$,
 - soit $= \mathbf{q^2 + Fq}$ (car $1-q = p$, et p est très proche de 1).

La probabilité d'avoir un enfant homozygote pour un allèle muté, donc atteint, dans le cas d'une maladie autosomique récessive dont la fréquence est q^2 , dans un mariage consanguin où le coefficient de parenté est F, est égale à $\mathbf{q^2 + Fq}$.

On trouve une plus grande proportion d'individus apparentés parmi les parents d'enfants atteints de maladies récessives.

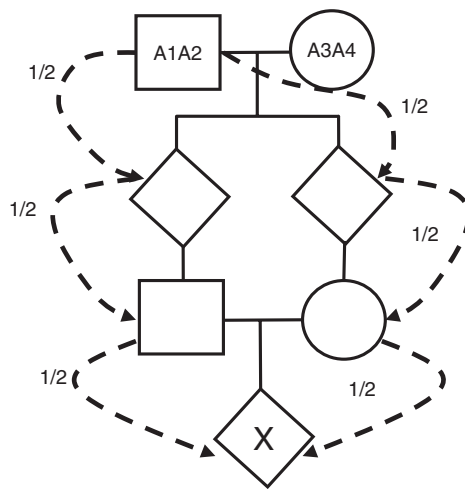
Risque relatif d'avoir un enfant atteint d'une maladie autosomique récessive (de fréquence q^2) dans un couple consanguin par rapport à la population générale.

$$RR = \frac{Fq + (1-F)q^2}{q^2}$$

On montre que plus la maladie est rare, plus le risque relatif pour les unions consanguines est important.

Exemple : risque d'avoir un enfant atteint de phénylcétonurie pour un couple de cousins germains.

Fréquence de la phénylcétonurie dans la population générale : $q^2 = 1/10\,000$



L'individu X a donc :

- une probabilité de $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/8$ d'avoir reçu l'allèle A1 au locus paternel ;
- une probabilité de $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/8$ d'avoir reçu l'allèle A1 au locus maternel ;
- une probabilité de $1/8 \times 1/8 = 1/64$ d'être homozygote pour cet allèle A1.

Selon le même raisonnement, il a une probabilité de $1/64$ d'être homozygote pour A2, pour A3 ou pour A4.

La probabilité qu'il soit homozygote pour l'un des 4 allèles ancestraux est donc de $1/64 \times 4 = 1/16$.

Figure 5.1

Exemple de calcul d'un coefficient de consanguinité.

$1/16$ = coefficient de consanguinité d'un individu issu de parents cousins germains.

Pour chaque allèle, X a $1/2^{m+p+2}$ chances d'être homozygote.

m = nombre de chaînons qui relient la mère à l'ancêtre commun.

p = nombre de chaînons qui relient le père à l'ancêtre commun.

Comme il y a 2 ancêtres, pour chaque ancêtre, X a $2 \times 1/2^{(m+p+2)} = 1/2^{(m+p+1)}$ chances d'être homozygote.

Coefficient de consanguinité F : $F = \sum 1/2^{(m+p+1)}$.

Σ = somme (on calcule $1/2^{(m+p+1)}$ pour chaque ancêtre).

R = risque d'être homozygote à ce locus du fait de la consanguinité

$$\begin{aligned} &= Fq + (1-F)q^2 \\ &= q^2 + Fq \text{ (voir paragraphe précédent)} \\ &= 1/10\,000 + (1/16 \times 1/100) \\ &= 1/10\,000 + 1/1\,600 \\ &= \mathbf{1/1\,600} \end{aligned}$$

RR = risque lié à la consanguinité/risque de la population générale.

$$1/1\,600 / 1/10\,000 = 6$$

Le risque est 6 fois plus élevé pour des cousins germains que pour un couple non apparenté.

Le risque est d'autant plus élevé que la maladie est rare.

Exemples :

- mucoviscidose ($q^2 = 1/3\,000$) : RR = 3,5 ;
- galactosémie ($q^2 = 1/40\,000$) : RR = 12 ;
- ataxie télangiectasie ($q^2 = 1/100\,000$) : RR = 20.

Conséquences de la consanguinité à l'échelle d'une population

Dans des populations fortement consanguines, quel est le retentissement sur les fréquences alléliques et génotypiques ?

On peut définir F_i = coefficient moyen de parenté dans une population non panmictique.

F_i = moyenne des coefficients de parenté des différents couples de la génération i .

Soit un locus di-allélique : allèles A1 et A2, de fréquences respectives p et q chez les parents. Soit F le coefficient moyen de parenté à la génération des parents.

À la génération suivante :

- $f(A1A1) = Fp + (1-F)p^2$;
- $f(A2A2) = Fq + (1-F)q^2$;
- $f(A1A2) = Fpq + (1-F)2pq$.

Soit :

- $f(A1A1) = p^2 + Fp(1-p)$;
- $f(A2A2) = q^2 + Fq(1-q)$;
- $f(A1A2) = 2pq - 2Fpq$.

Il y a donc un accroissement de la fréquence des homozygotes et une diminution de la fréquence des hétérozygotes (fréquences génotypiques).

En revanche, les fréquences alléliques restent inchangées.

Exemple :

$$\begin{aligned} f(A1) &= (p^2 + Fp(1-p)) + (1/2(2pq - 2Fpq)) = p^2 + Fpq \\ &+ pq - Fpq = p^2 + pq = p(p + q) = p \end{aligned}$$

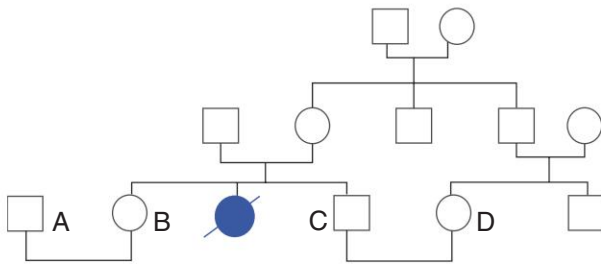
On en déduit que la consanguinité ne s'accompagne pas d'une détérioration du stock génique dans une grande population mais d'une augmentation de la morbidité pour les maladies autosomiques récessives.

Bibliographie

- Alfonso-Sánchez MA, Pérez-Miranda AM, García-Obregón S, et al. An evolutionary approach to the high frequency of the Delta F508 CFTR mutation in European populations. *Med Hypotheses* 2010; 74 : 989–92.
- Goriely A, McVean GA, Röjmyr M, et al. Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. *Science* 2003; 301 : 643–6.

- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 1995; 376 : 246–9.
- Risch N, Tang H, Katzenstein H, et al. Geographic distribution of disease mutations in the Ashkenazi Jewish population supports genetic drift over selection. *Am J Hum Genet* 2003; 72 : 812–22.
- Zlotogora J. High frequencies of human genetic diseases : founder effect with genetic drift or selection? *Am J Med Genet* 1994; 49 : 10–3.

ENTRAÎNEMENT 5 QCM-QCS



Les couples A-B et C-D vous consultent pour un conseil génétique. La sœur de Mme B et de Mr C était atteinte d'une maladie de Hurler. Il s'agit d'une maladie récessive autosomique qui atteint un enfant sur 90 000 naissances (1/90 000)

QCM 1

Concernant le risque de Mme B d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler, quelle(s) proposition(s) est (sont) exacte(s) ?

- A. Le risque pour Mme B d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 1/2
- B. Le risque pour Mme B d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 2/3
- C. Le risque pour Mme B d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 1/4
- D. Le risque pour Mme B d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est celui de la population générale
- E. Ce risque est indépendant du sexe de l'individu

QCM 2

Concernant le risque de Mr C et Mme D d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler, quelle(s) proposition(s) est (sont) exacte(s) ?

- A. Le risque pour Mr C d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 1/4

- B. Le risque pour Mr C d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 2/3
- C. Le risque pour Mme D d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 1/4
- D. Le risque pour Mme D d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 1/3
- E. Le risque pour Mme D d'être hétérozygote pour la maladie de Hurler est de 1/8

QCS 1

En vous servant de la loi de Hardy-Weinberg, quel est le risque que Mr A soit hétérozygote pour la maladie de Hurler ?

- A. 1/75
- B. 1/600
- C. 1/300
- D. 1/150
- E. 1/200

QCS 2

Quel est le risque pour le couple A-B d'avoir un enfant atteint de la maladie de Hurler ?

- A. 1/2 400
- B. 1/1 200
- C. 1/1 800
- D. 1/4 800
- E. 1/900

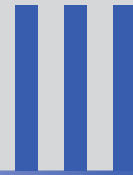
QCS 3

Quel est le risque pour le couple C-D d'avoir un enfant atteint de la maladie de Hurler ?

- A. 1/128
- B. 1/32
- C. 1/24
- D. 1/12
- E. 1/48

This page intentionally left blank

Partie



Génétique chromosomique

PLAN DE LA PARTIE

Cytogénétique conventionnelle	61
Cytogénétique moléculaire	75
Anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides	89

This page intentionally left blank

Cytogénétique conventionnelle

Technique et principales anomalies
(anomalies chromosomiques de nombre,
anomalies chromosomiques de structure,
anomalies des chromosomes sexuels)

Martine Doco-Fenzy

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	62
Technique	62
Principales anomalies	64
Indications	73

Introduction

Depuis 1959, date de l'observation de la première anomalie chromosomique chez l'homme (la trisomie 21), de très nombreux remaniements chromosomiques ont été décrits. La cytogénétique est l'étude de la structure et du fonctionnement normal et pathologique des chromosomes. La cytogénétique médicale a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre, de structure ou de réparation. La cytogénétique conventionnelle, abordée ici, utilise des techniques de culture cellulaire et microscopique (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) pour l'établissement du caryotype prénatal ou postnatal.

Technique

Cytogénétique constitutionnelle postnatale

Réalisation du caryotype

La réalisation du caryotype postnatal est encadrée par la loi. Les autorisations d'activité pour les structures sont délivrées par les agences régionales de santé (ARS) et l'agrément des praticiens par l'Agence de la biomédecine. Conformément au décret d'application en vigueur, le prélèvement doit être accompagné d'une attestation de consultation par le médecin prescripteur et d'un consentement du patient ou de son tuteur légal.

Un courrier doit préciser : le motif de prescription, les antécédents familiaux avec un arbre généalogique et tout renseignement clinique utile pour l'interprétation du caryotype.

Le tissu le plus souvent examiné est le sang total. Une quantité de 1 à 3 mL de sang prélevée stérilement sur héparinate de sodium ou lithium est nécessaire, ou plus rarement une biopsie cutanée mise extemporanément dans du milieu de culture stérile. Après une transfusion, le caryotype peut être effectué à partir de 3 jours car la plupart des lymphocytes du donneur sont alors éliminés.

Les cellules sanguines sont mises en culture en tubes, à l'étuve à 37 °C pendant 72 heures. Pendant ce temps, les lymphocytes stimulés par de la phytohémagglutinine (PHA) se divisent, puis le cycle cellulaire est bloqué par l'adjonction de colchicine. Les membranes nucléaires sont libérées par la mise au contact d'un mélange hypotonique (eau et KCl) : c'est « le choc ». Des culots cellulaires incolores sont obtenus

par centrifugation et sont étalés sur des lames de verre. À ce stade, les chromosomes sont difficilement reconnaissables et identiques pour certaines paires. Un marquage en bandes (R ou/et G) est donc nécessaire faisant apparaître une alternance de bandes claires et foncées sur les chromosomes après coloration. Les bandes R sont obtenues par dénaturation thermique et les bandes G par dénaturation chimique. Le niveau de résolution est défini comme le nombre de bandes identifiées sur les chromosomes du génome haploïde (23 chromosomes); il doit être suffisant et adapté à l'indication clinique, la résolution attendue est de 400 à 550 bandes. Les chromosomes de plusieurs mitoses sont enfin classés suivant la classification de Denver par ordre de taille et par indice centromérique pour former le caryotype. Le nombre de cellules examinées et le nombre de classements effectués sont définis par un guide de bonne pratique selon les indications. En moyenne : 15 mitoses et 3 classements par patient.

Si cela est nécessaire, les techniques de bandes complémentaires (bandes C, Q, NOR, etc.) ou les techniques de cytogénétique moléculaire seront réalisées en seconde intention. Les bandes C permettent de visualiser les centromères, les bandes Q permettent de repérer les régions hétérochromatiques des bras courts (p) des acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) et le bras long (q) du chromosome Y. Le marquage AgNOR est spécifique des bras p des acrocentriques. Ces techniques peuvent être complétées par la technique de FISH sur les métaphases ou sur les noyaux interphasiques (voir [chapitre 7, «Cytogénétique moléculaire»](#)). Les techniques de cytogénétique moléculaire sont guidées par les informations cliniques et/ou des données cytogénétiques.

Les anomalies sont rédigées suivant la nomenclature ISCN en vigueur (pour *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). Ex. : 47,XX,+21 ou 46,XY,t(4;11)(p11;q23).

Cas particuliers

Les variants

Les variants de structure classiques comportent des variations de taille et de position de l'hétérochromatine pour les chromosomes 1, 9 et 16, les bras p des acrocentriques et le bras long (q) de l'Y. Ils ne nécessitent pas d'étude familiale.

Les sites fragiles

Il faut distinguer les sites fragiles communs, qui surviennent en culture, et les sites fragiles rares, transmis de façon dominante. Les sites fragiles rares autosomiques sont sans signification pathologique et se présentent comme des cassures sur les bras chromosomiques.

L'X fragile

La cassure au locus Xq28, qui a donné son nom au syndrome de l'X fragile, sera plus facilement révélée dans une culture pauvre en folate. En cas de fragilité de l'X confirmée chez un patient symptomatique, l'étude familiale se fera par génétique moléculaire.

Les syndromes d'instabilité chromosomique

Ces maladies rares requièrent la mise en œuvre de protocoles spécifiques. Les cellules sont cultivées en présence d'agents cassants de type *Caryolysine* ou *méthotrexate*, qui vont favoriser l'apparition de cassures sur les chromatides, et d'images tri- ou tétraradiales sur les chromosomes.

Mosaïcisme

L'observation d'une ou deux cellules anormales pose la question d'un accident *in vitro*, d'une mitose incomplète ou d'un clone pathologique. L'observation de plusieurs clones constitue une mosaïque. D'après l'ISCN un clone se définit par la présence d'au moins 2 cellules comportant le même chromosome surnuméraire ou la même anomalie de structure, ou de 3 cellules ayant perdu le même chromosome. Ces critères seront interprétés en fonction de l'indication clinique, du nombre de cellules examinées, du type d'anomalie, de la situation sur la lame et de la durée de la culture (pour les fibroblastes) et un nouveau prélèvement sera parfois réalisé ou un autre tissu examiné. En cas de suspicion de mosaïcisme, le nombre de cellules étudiées est augmenté, au moins 50 cellules seront étudiées. Le résultat décrira le nombre de cellules observées « [-] » et les clones observés séparés par un « / ». Ex. : mos 45,X[15]/46,XX[5].

Les fibroblastes

Le caryotype peut être réalisé sur une culture de fibroblastes obtenue à partir d'une biopsie cutanée (volume > 2 mm³). Les cellules sontensemencées dans une boîte à fond plat sans PHA et sont récoltées à 70 % de confluence. Certaines anomalies chromosomiques sont préférentiellement dépistées sur des cultures de fibroblastes (ex. : i(12p) associé au syndrome de Pallister-Killian). Il peut donc y avoir discordance entre le sang et les fibroblastes (ex. : trisomie 8 en mosaïque).

Caryotype en haute résolution

Il s'agit d'un caryotype avec une résolution supérieure au caryotype conventionnel. Au moins deux paires analysables de chaque chromosome doivent atteindre un niveau de 850 bandes. Il est obtenu avec l'incorporation de *bromo-désoxyuridine* lors de la culture cellulaire suivie d'une coloration avec du colorant Hoechst et d'un traitement des lames par les UV.

Le caryotype en haute résolution est un examen de deuxième intention indiqué principalement pour confirmer un remaniement et identifier les points de cassure d'une anomalie de structure (translocation ou insertion) suspectée sur le résultat d'une technique de CGH-array ou de *multi-plex ligation-dependent probe amplification* (MLPA).

Cytogénétique constitutionnelle prénatale

Réalisation du caryotype

Voir [chapitre 15 « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »](#).

La cytogénétique prénatale est également encadrée par la loi. L'agrément des praticiens et l'autorisation de la structure sont sous la dépendance de l'ARH. Le laboratoire doit suivre les règles de bonne pratique définies par le ministère de la Santé (article R2131-1-1 du *Code de la santé publique*). Il doit connaître la législation en vigueur.

Les prélèvements fœtaux sont accompagnés de l'identification du médecin prescripteur, de l'attestation de consultation médicale de conseil génétique et du formulaire de consentement de la femme enceinte à la réalisation d'un prélèvement *in utero* en vue d'un diagnostic prénatal (article R2131-2 du *Code de la santé publique*, arrêté du 19 février 2010). L'interprétation sera facilitée par la fiche de renseignements comportant : l'indication, les antécédents personnels familiaux, obstétricaux, la date des dernières règles ou du début de grossesse et, selon l'indication : le compte rendu de l'échographie et le nom de l'échographiste, le résultat des marqueurs sériques, en cas de remaniement chromosomique d'un des conjoints, du caryotype de celui-ci. Le résultat sera transmis à la patiente par le médecin prescripteur (décret N° 2000-570 du 23 juin 2000).

Le caryotype fœtal sera effectué chronologiquement sur un échantillon de villosité chorale (20 mg), ou de liquide amniotique (≥ 15 mL) ou de sang fœtal (≥ 1 mL). Si l'échantillon est en quantité insuffisante et/ou mélangé à du sang ou de la caduque en forte proportion, le résultat pourra être faussé. Le prélèvement sera acheminé et ensemencé sous 24 h si possible.

Les cellules sont mises en culture sur des boîtes à fond plat ou sur des lamelles. Pour les cultures sur flacons à fond plat, les cellules sont décollées avec de la trypsine. Les cellules sont choquées, puis marquées et colorées (voir [chapitre 6, «Cytogénétique conventionnelle»](#)). Un marquage en bandes R ou/et G est obligatoire, avec un niveau de résolution de 400 bandes. Pour le sang fœtal, le caryotype est tardif et réalisé suivant le même mode opératoire que pour le postnatal.

Villosités chorales

Les protocoles d'analyse sont discutés. Les techniques doubles associant culture à court terme et culture à long terme sont à privilégier. Des techniques rapides sont demandées par les obstétriciens, telles que la technique de FISH ou celles de QPCR, MLPA, BOBs, ou un examen direct en cytogénétique (témoin des mitoses spontanées du prélèvement). Dans le cas où la quantité du matériel reçu ne permet pas les deux techniques, la culture à long terme est privilégiée. Un examen partiel à partir du court terme est recommandé (FISH interphasique ou caryotype sur quelques cellules) afin de s'assurer de la concordance des résultats. Pour la préparation directe ainsi qu'après culture, 12 mitoses sont comptées et 3 caryotypes établis avec une résolution de 400 bandes pour permettre une analyse structurale des chromosomes, dans un délai de 14 jours.

Liquide amniotique

La culture peut être réalisée *in situ* sur des lamelles ou dans des flacons. La méthode *in situ* est privilégiée. Pour les flacons, la récolte des cellules se fait par trypsination. La culture se fera avec 2 boîtes de culture de 2 milieux différents et sera maintenue jusqu'au compte rendu écrit. Ensuite, 15 cellules sont comptées provenant de 2 boîtes de culture et 3 caryotypes sont établis. Pour la méthode *in situ*, les lames sont colorées et placées sous le microscope pour saisir les images. Ainsi, 12 mitoses sont comptées sur au moins 12 colonies différentes provenant de 2 cultures distinctes et 3 caryotypes sont établis.

La résolution doit être d'au moins 400 bandes dans un délai de 14 jours.

Mosaïques

Il faut différencier les artéfacts de culture des mosaïques. La découverte de 2 mitoses ayant la même anomalie chromosomique, provenant de flacons indépendants, impose des investigations complémentaires. L'examen sera complété par l'analyse d'autres mitoses de flacons distincts ou par des investigations complémentaires (voir [chapitre 15, «Diagnostic prénatal et préimplantatoire»](#)).

Limites du diagnostic

Les conditions d'analyse d'un caryotype fœtal peuvent ne pas identifier une mosaïque fœtale vraie si le taux des cellules aneuploïdes est trop faible. De plus, une anomalie fine de la structure des chromosomes peut être méconnue en fonction du degré de résolution obtenu.

Analyses complémentaires

Voir [chapitres 7 \(«Cytogénétique moléculaire»\)](#), [15 \(«Diagnostic prénatal et préimplantatoire»\)](#) et [21 \(«Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées»\)](#).

Les analyses par FISH, QF-PCR, QMPSE, BOB, MLPA, etc. seront proposées selon les indications. Il s'agit d'études partielles sur les loci testés.

Les techniques de génétique moléculaire recherchant une disomie uniparentale sont proposées quand un chromosome soumis à empreinte parentale est impliqué dans un remaniement de structure, ou dans une anomalie de nombre en mosaïque (éventuellement confinée au placenta).

Principales anomalies

Épidémiologie

Depuis 1959, date de l'observation de la première anomalie chromosomique, la trisomie 21, suivie en 1960 par celle du chromosome Philadelphie t(9;22)(q34;q11), de très nombreux remaniements chromosomiques constitutionnels ou acquis ont été identifiés. Les anomalies chromosomiques (AC) constitutionnelles sont présentes dès la conception ou se forment dès les premières divisions zygotiques. On distingue les anomalies de nombre (AN), résultant d'une anomalie de la fécondation ou d'une mauvaise répartition (ségrégation) des chromosomes lors de la division cellulaire, et les anomalies de structure (AS) qui impliquent une ou plusieurs cassures chromosomiques suivies d'un recollement anormal.

La littérature sur la fréquence des AC constitutionnelles est souvent antérieure aux techniques de bandes, qui plus est de la technique d'ACPA (analyse chromosomique sur puce à ADN), et sous-évalue le nombre d'AS. En effet, l'ACPA révèle de nombreuses AS pathogènes ou non, jusqu'ici méconnues.

Il existe chez l'homme une très forte sélection de la conception à la naissance portant essentiellement sur les anomalies des autosomes à l'exception de la monosomie X. La proportion des anomalies chromosomiques est de 60 % dans les avortements du premier trimestre qui représentent 15 % des grossesses. Elle diminue dans les avortements tardifs et les enfants

mort-nés (moyenne de 5 %). Au moins 0,6 à 0,9 % des enfants nés vivants sont porteur d'une anomalie chromosomique par cytogénétique conventionnelle. En 1977, l'estimation était de 1/344 nouveau-nés porteurs d'anomalie chromosomique pathogène, en 1996, 1/268 et en 2007, 1/157. Cette progression est due à la meilleure résolution des techniques employées. Les enfants mort-nés présentent 4 à 10 % d'anomalies chromosomiques en fonction des études. À la naissance les AN, les plus fréquentes concernent les gonosomes et les autosomes avec les caryotypes 47,XXY, 47,XXX, et 47,XYY (1/1000 naissance du sexe concerné) pour les gonosomes, et les trisomies dont la trisomie 21 pour les autosomes (1,4/1000 dont 1,2/1000 trisomies 21). Les AS les plus fréquentes sont les translocations équilibrées robertsoniennes qui concernent les chromosomes acrocentriques et les translocations réciproques qui concernent tous les chromosomes (0,9/1000 vs 0,9 à 1,4/1000).

Les AS non équilibrées identifiées par le caryotype sont trouvées le plus souvent chez des enfants polymalformés avec un retard de développement et ou une déficience intellectuelle. Elles sont relativement « peu fréquentes » dans la population générale : par rapport aux CNV identifiés en ACPA, on estime à environ 15 % le nombre de CNV pathogènes, non identifiables sur un caryotype, mis en évidence en ACPA chez les patients présentant un syndrome malformatif avec ou sans déficience intellectuelle (voir [chapitre 7, « Cytogénétique moléculaire »](#)).

Des anomalies acquises de nombre et ou de structure équilibrées ou non équilibrées, clonales ou non clonales, sont fréquemment observées dans les hémopathies et les tumeurs solides. Plusieurs anomalies peuvent être observées et les caryotypes sont alors plus complexes que les caryotypes constitutionnels. Les facteurs sélectifs sont différents (voir [chapitre 8, « Cytogénétique des anomalies acquises en hématologie et des tumeurs solides »](#)).

Les anomalies de nombre (AN)

Les AN affectent le nombre de chromosomes. Elles sont homogènes, c'est-à-dire présentes dans toutes les cellules étudiées ou en mosaïque sachant qu'il est impossible d'étudier toutes les cellules d'un organe, encore moins de l'organisme.

Les AN homogènes résultent le plus souvent d'une non-disjonction méiotique. En 1^{re} ou 2^e division de méiose, les chromosomes d'une même paire doivent migrer chacun dans une cellule fille; une non-disjonction est le fait que deux chromosomes migrent dans la même cellule fille en anaphase. Ceci concerne deux chromosomes homologues pour la 1^{re} division et deux chromatides sœurs pour la 2^e. Dans le premier cas, le gamète reçoit un chromosome paternel et un chromosome maternel de la même paire; dans le

deuxième cas, il reçoit deux exemplaires d'un même chromosome parental (paternel ou maternel). Du fait des recombinaisons (*crossing-over*) qui surviennent avant la 1^{re} division de méiose, les deux copies ne sont pas génétiquement identiques comme le montre l'étude des polymorphismes de l'ADN. Ainsi, il a été observé que les non-disjonctions sont souvent d'origine maternelle et favorisées par l'âge maternel.

Les AN peuvent être en mosaïque. Les mosaïques résultent d'accidents post-zygotiques après la fécondation. Ces non-disjonctions peuvent se traduire par une trisomie ou d'une monosomie : il s'agit alors d'une aneuploïdie. Le zygote d'origine peut être porteur d'une AN ou pas. S'il est porteur d'une monosomie ou d'une trisomie, la correction de la trisomie peut entraîner une disomie uniparentale.

Exceptionnellement, il peut coexister chez un même individu deux populations cellulaires issues de deux zygotes différents; on parle alors de chimère. Elles sont dues à des accidents de la fécondation proprement dite, tels que la double fécondation.

Les trisomies

Les trisomies (présence d'un chromosome surnuméraire) autosomiques les plus fréquentes en prénatal sont les trisomies 13, 16 et 18. Les trisomies autosomiques les plus fréquentes à la naissance sont les trisomies 13 (syndrome de Patau), 18 (syndrome d'Edwards), 21 (syndrome de Down), la trisomie 8 et la trisomie 9 qui sont souvent en mosaïque. Concernant les gonosomes X ou Y, les trisomies sont très fréquentes : 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY mais des tétrasomies ou pentasomies sont également observées 48,XXXX, 49,XXXYY. Ces anomalies sont homogènes ou en mosaïque et comportent au moins un chromosome X.

Les monosomies

Les monosomies (perte d'un chromosome) autosomique sont rarement observées à la naissance. Les embryons porteurs de ces anomalies ne sont pas viables et sont expulsés dès les premiers stades de la vie embryonnaire. Concernant les gonosomes, la monosomie X est responsable du syndrome de Turner. Les AN des gonosomes sont souvent en mosaïque. Voir [chapitre 2, « Structure et fonction du génome humain : particularité des chromosomes sexuels, inactivation du chromosome X »](#).

Les polyploïdies

Les non-disjonctions peuvent impliquer des lots haploïdes entiers de 23 chromosomes. Les polyploïdies correspondent à un nombre anormal de lots haploïdes. La plus

fréquente est la triploïdie qui comporte 3 lots de chromosomes ($3n$) 69,XXX, 69,XXY, 69,XYY. Les triploïdies sont dues à des non-disjonctions méiotiques (diplopermie, ou digynie) ou à des accidents de fécondation (dispermie). Les tétraploïdies ($4n$) sont parfois observées à la naissance (92,XXXX, 92,XXYY). Ces polyploïdies sont parfois associées en mosaïque ou avec des clones normaux. Le nombre de lots haploïdes peut être plus important dans les tumeurs.

Les anomalies de structure (AS) (figure 6.1)

Les AS concernent la modification de la succession de plusieurs loci sur les chromosomes et peuvent affecter un chromosome ou plusieurs, homologues ou non, et survenir ou non *de novo*. Par définition, les trisomies et monosomies partielles résultent de remaniements de structure. Si le réarrangement ne s'accompagne ni de perte ni de gain de matériel génétique,

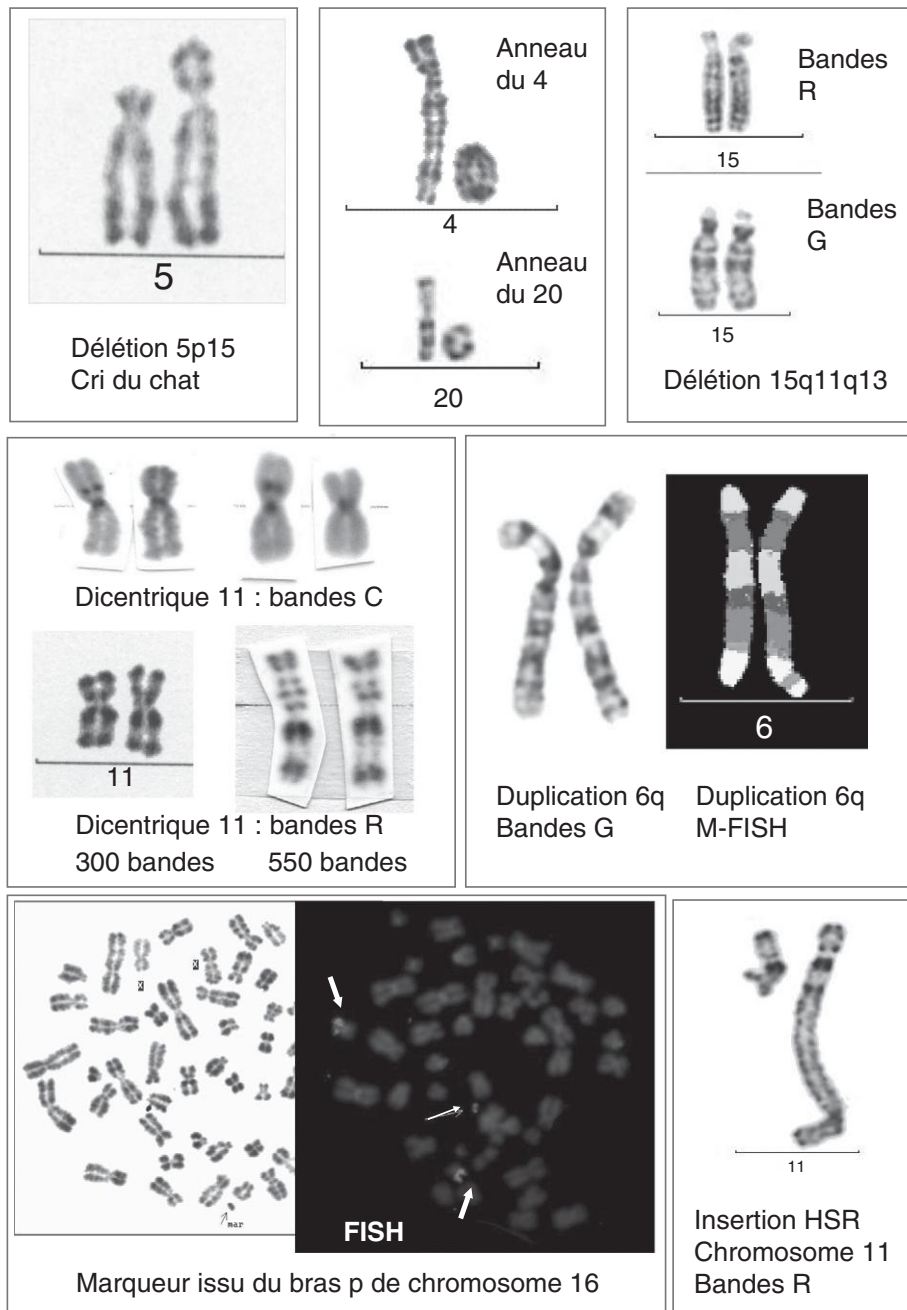


Figure 6.1

Anomalies de structure.

il est dit «équilibré» et n'a habituellement pas de traduction clinique; dans le cas contraire, l'anomalie est déséquilibrée, avec des manifestations cliniques d'autant plus marquées que la taille du déséquilibre est importante. Dans le cas des CNV, les AS n'ont pas toujours de traduction clinique à l'inverse; parfois, dans un remaniement équilibré, un point de cassure interrompt un gène et entraîne une maladie génique en rapport.

Mécanismes

Selon la définition classique, les AS sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs recollements anormaux. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer la survenue des cassures. Les progrès de la cytogénétique moléculaire ont conduit à proposer trois grands modèles pour expliquer les remaniements du génome humain (voir chapitre 7, «Cytogénétique moléculaire»). La recombinaison homologue non-allélique (*non-allelic homologous recombination* ou NAHR). Elle survient pendant la méiose ou la mitose et nécessite deux répétitions segmentaires (*low copy repeats*), parfois alignées à la place des copies alléliques. Les recombinaisons dans ces mésappariements ou NAHR peuvent entraîner des duplications et/ou délétions ou des inversions. Elles génèrent des remaniements récurrents chez des individus différents, avec une taille et des points de cassure communs, dont l'exemple le plus fréquent est la microdélétion 22q11. À l'inverse, la taille et la localisation des remaniements non récurrents varient d'un patient à l'autre.

Ils peuvent s'expliquer par le modèle de jonction d'extrémités non homologues (*non homologous end-joining* ou NHEJ). C'est un mécanisme de réparation des cassures d'ADN double-brin qui nécessite de très courtes séquences de micro-homologie. Le 3^e est celui de l'interruption de la fourche de réplication et commutation de la matrice (*fork stalling and template switching* ou FoSTeS); il s'agit de remaniements basés sur la réplication.

Conséquences

Les aberrations ou remaniements peuvent porter sur un ou plusieurs chromosomes.

Si l'anomalie est équilibrée, il n'y a généralement pas de conséquence clinique pour le sujet porteur, mais elles peuvent entraîner la formation de gamètes déséquilibrés donnant des zygotes anormaux à l'origine d'avortements ou de la naissance d'enfants porteurs d'anomalies congénitales.

Au cours de la méiose, les chromosomes homologues de chaque paire s'apparient pour former des *bivalents* (ou tétrades). Cet appariement s'accompagne de recombinaisons génétiques

entre les génomes parentaux. Puis, les bivalents se séparent et chacun des homologues migre dans une cellule fille différente. En cas d'anomalie chromosomique, l'appariement des régions homologues peut être altéré, les chromosomes remaniés s'associent de manière plus ou moins complexe et reproduisent la figure de l'événement qui a généré les cassures. Ainsi, dans le cas d'une translocation réciproque, on observe des tétrades comprenant les quatre chromosomes (deux paires) impliqués. La ségrégation sera équilibrée si les deux chromosomes non remaniés migrent ensemble vers un pôle et les deux remaniés vers l'autre. Un gamète sera normal et l'autre porteur de la translocation équilibrée (voir figure 6.3). Mais parfois deux homologues migrent ensemble ou trois chromosomes partent vers le même pôle cellulaire. Le gamète résultant sera déséquilibré et donnera un embryon avec un fragment chromosomique en triple exemplaire et un fragment manquant.

En fonction du déséquilibre, la grossesse évoluera ou non. Quand le déséquilibre est grand, la grossesse se termine par une fausse couche spontanée qui peut survenir avant tout retard de règle. La possibilité de survie est plus élevée en cas de déséquilibre de petite taille. Il y a alors un risque de retentissement clinique associant déficience intellectuelle et malformations.

Pour toutes les translocations, différents types de ségrégation coexistent avec des fréquences variables en fonction de la taille des chromosomes impliqués et de la localisation des points de cassure.

Si l'anomalie est déséquilibrée, les conséquences cliniques dépendent du nombre et du rôle des gènes du segment chromosomique en excès ou défaut. Il existe des déséquilibres en perte ou gain bénins et de taille supérieure à 5 Mb, néanmoins les gains sont moins délétères que les pertes pour un segment donné.

Les AS touchant un seul chromosome diffèrent des AS touchant deux chromosomes qui impliquent un échange de matériel génomique.

Aberrations survenant sur un seul chromosome

Délétion(s)

Les délétions résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale), ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion interstitielle). Elles surviennent le plus souvent *de novo* mais dans 10 à 15 % des délétions terminales, la délétion résulte de la mauvaise ségrégation d'une translocation parentale équilibrée avec une trisomie partielle pour un autre chromosome.

La taille des délétions du génome peut concerner quelques b à plusieurs Mb. Classiquement, seules les délétions de plus de 5 Mb seront vues en cytogénétique conventionnelle telles que les délétions 4p (syndrome de Wolff-Hirschhorn), 5p (cri du chat), 11p13p13 (syndrome WAGR). De nombreuses autres microdélétions ont une taille d'environ 4 Mb, dont certaines pourront être identifiées sur le caryotype en haute résolution et surtout en cytogénétique moléculaire.

Les microdélétions seront revues dans le [chapitre 7](#) («[Cytogénétique moléculaire](#)»). Différents syndromes cliniques en sont la conséquence : syndromes de Williams (7q11.23), de Prader-Willi ou d'Angelman (15q11.q13), de Smith-Magenis (17p11.2), de Miller-Dieker (17p13), de DiGeorge, VCF (22q11) ou de Kalmann (Xp22.3).

Chromosome en anneau (r)

Les anneaux résultent le plus souvent d'une cassure à chaque extrémité d'un chromosome suivie d'un recollement avec perte des segments distaux. Ces anneaux sont instables lors de la mitose; ils peuvent être perdus et/ou se transformer. Les échanges mitotiques entre chromatides sœurs engendrent des dérivés complexes avec duplications/déficiences des régions d'origine, ce qui engendre un phénotype variable. Les anneaux des chromosomes X et 20 sont les plus fréquents et souvent en mosaïque. L'anneau du chromosome 20 qui remplace le chromosome 20 ([figure 6.1](#)) est associé à un syndrome comportant une épilepsie pharmacorésistante. L'anneau du chromosome X est souvent associé à un syndrome de Turner; si le locus Xist est délété, une disomie fonctionnelle du chromosome X normalement inactif est générée avec une déficience intellectuelle (voir [chapitre 2](#), «[Structure et fonction du génome humain : particularité des chromosomes sexuels, inactivation du chromosome X](#)»).

Inversion (inv) ([figure 6.2](#))

Les inversions sont dues à deux cassures, suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire. Elles sont péricentriques si le centromère est compris dans le segment intermédiaire, et paracentriques si les deux cassures sont sur le même bras. Ces inversions sont équilibrées mais elles entraînent des difficultés d'appariement méiotique. Souvent, une boucle d'appariement se forme. Si le centromère est dans la boucle (inversion péricentrique), la survenue d'une recombinaison dans le segment inversé entraîne la formation de gamètes anormaux par duplication/déficience portant sur les segments distaux par rapport aux points de cassure. Plus ces segments sont grands, plus grande est la létalité. Pour les inversions paracentriques, les chromosomes

recombinés seront dicentriques ou acentriques, et donc peu susceptibles de donner un zygote viable. En effet, ces chromosomes sont instables au cours des divisions mitotiques.

Isochromosome (I)

Un isochromosome est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec perte de l'autre bras. Il peut être monocentrique ou dicentrique selon le mécanisme de formation. L'isochromosome le plus souvent rencontré est l'isochromosome pour le bras long du chromosome X qui constitue une variante cytogénétique du syndrome de Turner. Un isochromosome peut remplacer un chromosome normal, ou coexister avec les deux chromosomes normaux de la même paire réalisant alors une tétrasomie pour le bras dupliqué (ex. : tétrasomie 12p secondaire à la présence d'un i(12p) et syndrome de Pallister-Killian).

Chromosomes dicentriques

Ces chromosomes résultent de la fusion, souvent dans les régions télomériques ou centromériques, de deux chromosomes homologues ou non homologues. Lorsque les deux centromères sont suffisamment éloignés, l'un d'entre eux perd sa fonction, formant un pseudodicentrique.

Duplication intrachromosomique

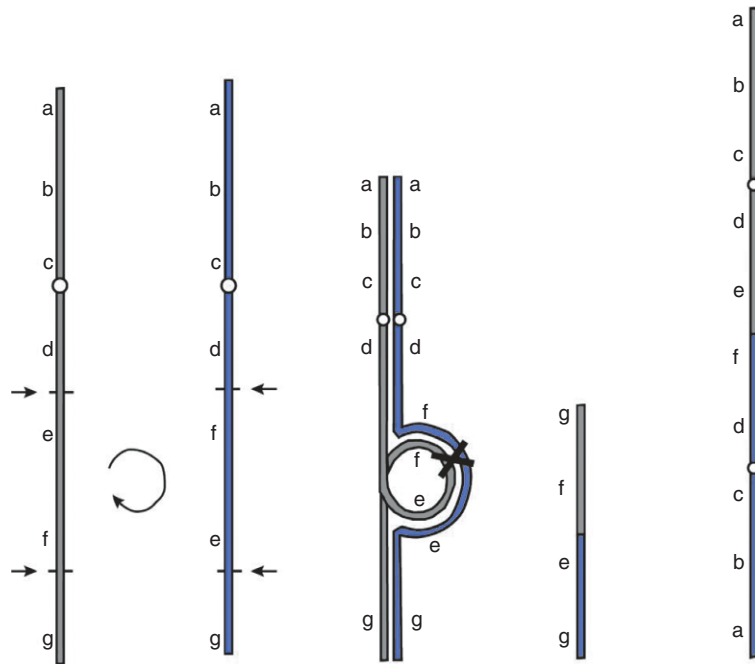
Présence en double exemplaire d'une région chromosomique. Ce sont des remaniements rarement identifiés en cytogénétique conventionnelle et qui aboutissent à des trisomies partielles pures. Ces duplications sont parfois non symptomatiques (voir [chapitre 9](#), «[Anomalies génétiques à l'échelle du gène](#)»). Les duplications chromosomiques peuvent se produire soit en tandem (directes), si le fragment dupliqué conserve la même orientation que le fragment d'origine, soit en miroir (inversé) si le fragment dupliqué a une orientation inverse.

Petits chromosomes surnuméraires (mar)

Les petits chromosomes surnuméraires (marqueurs) sont de taille inférieure à celle d'un chromosome du groupe G (chromosomes 21, 22) et d'origine inconnue. Ils génèrent une trisomie partielle pour une région du génome formée d'euchromatine et ou d'hétérochromatine. Le contenu génétique de ces «marqueurs» peut être identifié par différentes techniques de bandes et de coloration, par la technique de M-FISH (FISH multicolore) ou l'ACPA. Les conséquences cliniques seront variables, d'autant plus que ces marqueurs sont souvent en mosaïque. Ils peuvent être transmis de manière homogène.

Inversion paracentrique

Formation de gamètes avec chromosome acentrique ou dicentrique



Inversion péricentrique

Formation de gamètes déséquilibrés avec duplication et déficience

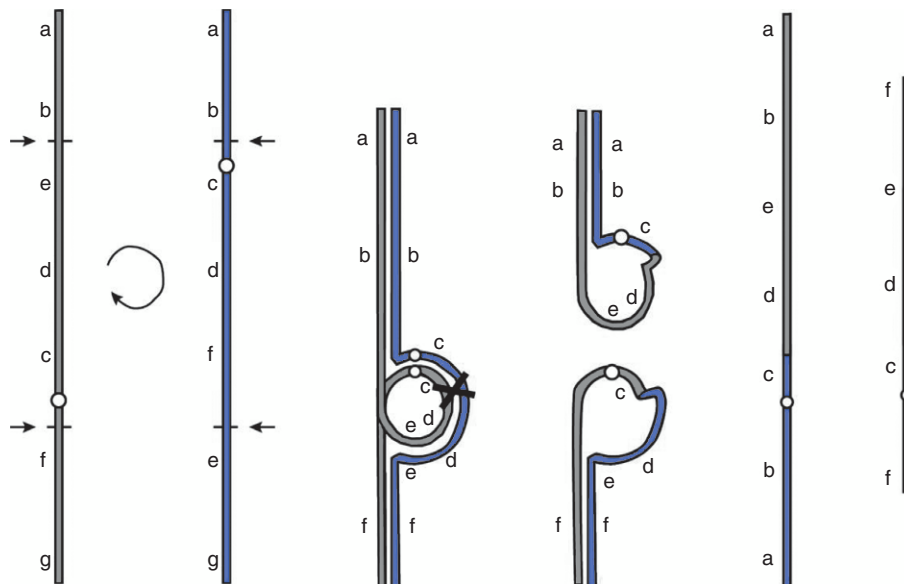


Figure 6.2
Inversions.

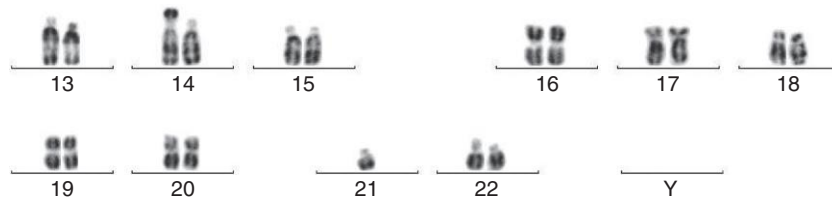
Aberrations survenant sur plus d'un chromosome

Il s'agit dans ce contexte surtout de translocations. Elles sont caractérisées par deux cassures sur deux chromosomes différents, le plus souvent non homologues, et recollement après échange des fragments distaux. Les deux formes majeures sont les translocations réciproques ou robertso-

niennes; elles peuvent être équilibrées ou non équilibrées et survenir *de novo* ou être héritées et/ou transmises. Les insertions sont plus rares et plus difficiles à observer.

Translocations robertsoniennes (rob) (figure 6.3)

Elles se produisent entre chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 ou 22) par fusion centrique ou par cassures



Formule : 45,XX,rob(14;21)(q10;q10)

SÉGRÉGATION MÉIOTIQUE

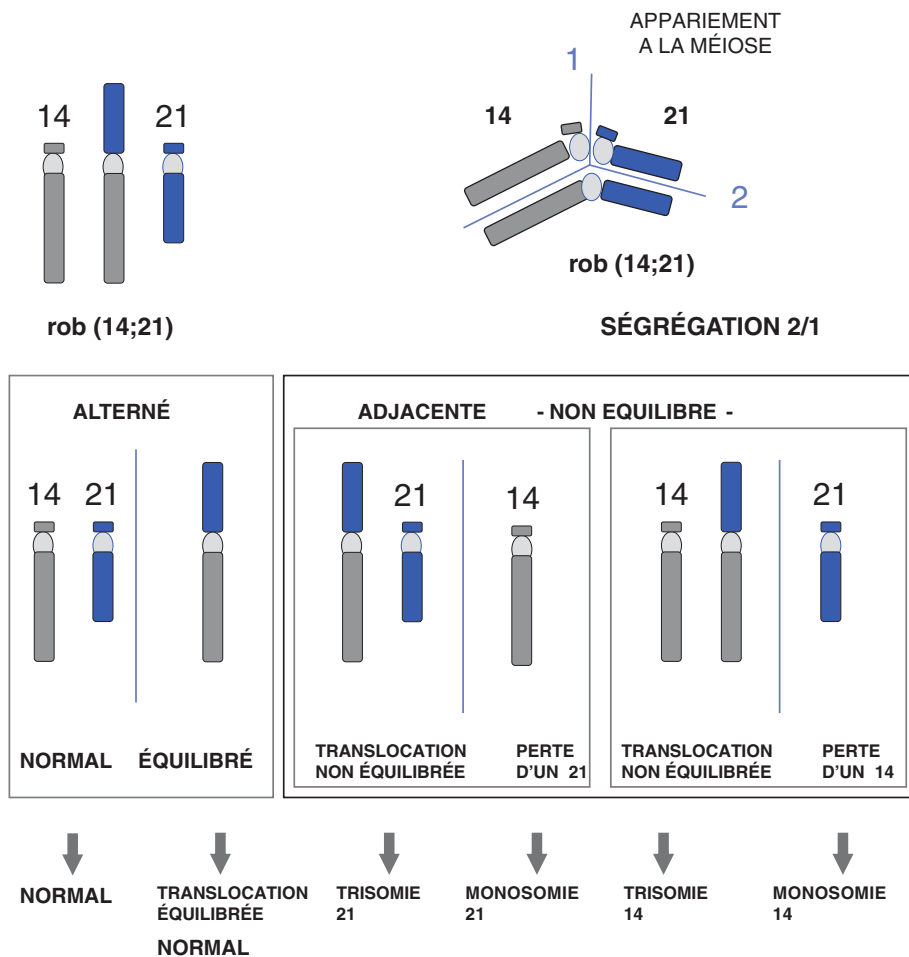


Figure 6.3

Translocations robertsoniennes.

dans les régions juxta-centromériques. Les patients porteurs sains d'une translocation rob ont un caryotype à 45 chromosomes car le fragment composé des bras courts des acrocentriques est perdu sans traduction clinique. Lors de la méiose, il existe un risque de formation de quatre types de gamètes déséquilibrés donnant des zygotes trisomiques ou monosomiques pour la totalité d'un chromosome. Les translocations rob sont responsables de la majorité des formes familiales de trisomie 21 et 13, le caryotype comporte alors 46 chromosomes. Si une translocation rob est formée de deux acrocentriques homologues, les gamètes formés seront tous déséquilibrés. Le risque de récurrence à la naissance de trisomie est alors de 100 %. L'étude des polymorphismes de l'ADN montre qu'il s'agit le plus souvent d'isochromosomes et non de translocations rob proprement dites. Ils s'accompagnent d'un risque de disomie uniparentale.

Translocations réciproques (t) (figure 6.4)

Ces translocations t sont dues à des échanges de segments chromosomiques le plus souvent entre deux chromosomes; les points de cassure sont en dehors des régions juxta-centromériques des acrocentriques.

Les patients porteurs de translocations t équilibrées n'ont pas de phénotype particulier en dehors de troubles de la fertilité. En effet, lors de la méiose, les chromosomes s'apparient sous forme de tétravalents et non de bivalents. Il existe alors différentes possibilités de ségrégation générant des gamètes normaux, équilibrés ou déséquilibrés. Les trois grands types de ségrégation sont par ordre de fréquence :

- le type 2:2 : deux chromosomes dans chaque gamète;
- le type 3:1 : trois chromosomes dans un gamète alors qu'un seul est transmis dans l'autre;
- le type 4:0 : quatre chromosomes dans un gamète et 0 dans l'autre.

Les ségrégations de type 2:2 sont alternes ou adjacentes (adjacente 1 ou 2) et donnent des zygotes ayant 46 chromosomes. Les ségrégations les plus fréquentes sont alternes et produisent des gamètes équilibrés ou normaux. Les ségrégations de type adjacent sont responsables de la formation de gamètes non équilibrés :

- le type adjacent 1 : l'un des deux chromosomes remaniés est transmis avec l'homologue normal de l'autre chromosome donnant une duplication de l'un des segments transloqués et une monosomie de l'autre segment. Les deux combinaisons réciproques sont possibles;
- le type adjacent 2 est exceptionnel : l'un des deux chromosomes remaniés est transmis avec son propre homologue.

Les ségrégations de type 3:1 sont rares et les zygotes qui en résultent ont 45 ou 47 chromosomes. Elles sont favorisées par l'implication d'un acrocentrique dans la translocation comme dans la translocation récurrente t(11;22). Les deux chromosomes remaniés peuvent être transmis avec un homologue normal, ou un seul chromosome remanié est transmis avec les deux homologues normaux.

Insertions (ins)

Les insertions se traduisent par le transfert d'un segment intercalaire d'un bras de chromosome à l'intérieur du bras d'un autre segment chromosomique. Elles résultent d'un mécanisme à trois cassures, deux sur le chromosome donneur et une sur le chromosome receveur. Les chromosomes donneur et receveur peuvent être un seul et même chromosome (insertion ou translation intrachromosomique). Le segment inséré peut conserver son orientation par rapport au centromère ou s'inverser. Des gamètes monosomiques ou trisomiques pour le segment inséré pourront être formés lors de la méiose.

Remaniements plus complexes ou particuliers

Remaniements complexes

Les remaniements chromosomiques complexes sont plus rares; ce sont des AS impliquant au moins trois chromosomes et trois points de cassure ou plus.

Instabilité chromosomique

Cassures chromosomiques

Dans certains cas particuliers, on observe sur plusieurs mitoses des cassures chromatidiennes, des images triradiales ou quadriradiales. Ces figures sont le reflet d'une instabilité chromosomique liée en général à des altérations géniques perturbant la phase de réparation des anomalies nucléotidiques. Il faut utiliser des techniques particulières pour observer ces remaniements chromosomiques. La recherche d'une instabilité chromosomique est par exemple recherchée en cas de suspicion d'anémie de Fanconi.

Chromothripsis

Dans certaines tumeurs, il est observé des chromosomes dits « arlequins » formés de plusieurs fragments chromosomiques organisés de manière anarchique appelés « chromothripsis ». C'est un événement « cataclysmique » survenant soit sur un chromosome unique, soit sur un bras de chromosome ou sur un tout petit nombre de chromosomes qui subissent une fragmentation importante suivie d'un

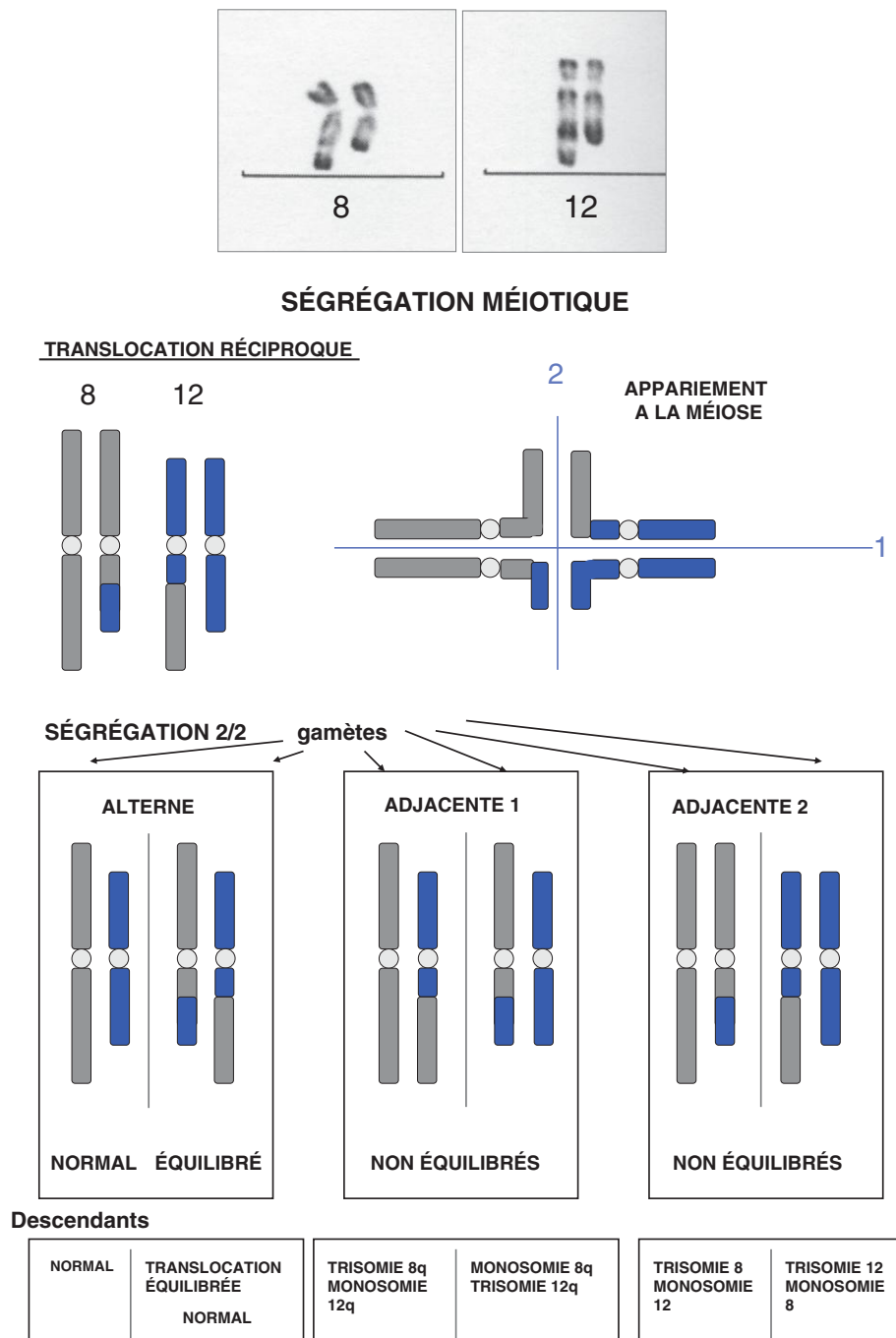


Figure 6.4

Translocations réciproques.

réassemblage. Ce phénomène est surtout identifié par la technique d'ACPA. Il peut être vu dans 2 à 3 % des tumeurs, mais parfois en constitutionnel.

Fragilité chromosomique : sites fragiles

Certains individus présentent une zone de fragilité constitutionnelle localisée sur un autosome donné. Ces sites fra-

giles rares sont transmis de façon dominante et n'ont pas d'effet phénotypique connu. Les autosomes et les sites les plus souvent observés sont : 2q11, 10q23, 10q25, 11q13, 16p12, 16q22, 17p12, 20p11. Ils sont parfois liés à l'origine phylogénique du chromosome (exemple du chromosome 2 formé de la fusion de deux acrocentriques).

Le cas du chromosome X est particulier avec l'existence d'un site fragile en Xq27.3. Ce site fragile a été observé chez des garçons avec une déficience intellectuelle syndromique, d'où le nom de « syndrome de l'X fragile ». La transmission est celle d'une pathologie liée à l'X à expressivité variable et pénétrance incomplète chez les femmes.

Régions HSR (homogeneously staining region)

Existent dans certaines tumeurs des chromosomes géants ou des régions de grande taille présentant un aspect uniforme après le marquage en bandes dit « HSR ». Ces régions sont des amplifications présentant un nombre de copies très élevé de régions chromosomiques ou de gènes (ex. : MDM2 dans le liposarcome).

Microremaniements

Il s'agit de remaniements de taille inférieure à 5 Mb, niveau de résolution du caryotype. Ces microdélétions/duplications sont nombreuses (1 naissance sur 1 000) et sont générées notamment par la présence de séquences répétées du génome (voir [chapitres 1, « Architecture du génome », et 7, « Cytogénétique moléculaire »](#)). La technique d'ACPA détecte des CNV de taille 50 à 100 kb. L'interprétation phénotypique en reste délicate : certains microremaniements sont liés à de nouveaux syndromes chromosomiques, d'autres sont potentiellement pathogènes ou facteurs de prédisposition, avec pénétrance et/ou expressivité variable. Les techniques du séquençage haut débit et du *whole-genome* permettront d'explorer les bornes de ces microremaniements.

Il existe dans les tumeurs de très petits chromosomes surnuméraires, comportant plusieurs copies de certaines régions du génome, appelés « double minute ».

Indications

La demande de caryotype doit être accompagnée de la description des signes cliniques afin d'orienter l'ensemencement et les analyses réalisées. La résolution attendue et le nombre d'objets étudiés (métaphases et/ou noyaux) dépendront de l'indication clinique. Quand demander un caryotype ?

Diagnostic prénatal

Voir [chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantaire »](#).

L'examen peut être réalisé soit sur villosités chorales dès la 11^e–12^e semaine d'aménorrhée, soit sur amniocytes à partir de la 14^e–15^e semaine, soit enfin sur sang fœtal après la 20^e semaine. Ces techniques de prélèvement invasives sont toutes associées à un risque de fausse couche (0,1 %–1 % des cas pour l'amniocentèse, 1 % à 1,5 % pour la biopsie de villosité chorale, 3 %–5 % pour la ponction de sang fœtal), ce qui les réserve à des situations associées à un risque accru d'anomalie chromosomique fœtale. Les indications sont réglementées suivant la législation en vigueur :

- âge maternel supérieur ou égal à 38 ans le jour de la ponction;
- signe d'appel biologique (risque calculé > 1/250 après dosage des marqueurs sériques);
- signe d'appel échographique;
- antécédent d'enfant porteur d'une anomalie chromosomique;
- caryotype parental remanié;
- diagnostic de sexe en l'absence de génétique moléculaire.

Il peut s'agir aussi du contrôle invasif d'un résultat de diagnostic prénatal sur sang maternel (DPNI).

Diagnostic postnatal constitutionnel

Les indications sont diverses et non soumises aux restrictions de la législation; les plus fréquentes sont les suivantes :

- ambiguïté sexuelle;
- clinique évocatrice d'un syndrome chromosomique connu : trisomies 21,13,18, délétions 4p, 5p, syndromes de Turner (45,X et autres), de Klinefelter (47,XXY);
- syndrome polymalformatif (malformation cardiaque, dysmorphie faciale, etc.) et/ou déficience intellectuelle;
- retard ou absence de règles, aménorrhée, ménopause précoce;
- retard de croissance, petite taille;
- infertilité, fausses couches à répétition;
- enquête familiale lors de la découverte de certaines anomalies équilibrées ou déséquilibrées;
- suspicion d'instabilité chromosomique;
- enquête familiale suite au diagnostic prénatal d'une anomalie chromosomique.

Hématologie, cancérologie

Voir [chapitre 8, « Anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides »](#).

Les cellules tumorales sont souvent associées à des remaniements chromosomiques, parfois spécifiques (« chromosome Philadelphie » de la leucémie myéloïde chronique, par exemple, qui résulte d'une translocation $t(9;22)$, ou $t(18;X)$ dans le synoviosarcome).

Au cours des processus tumoraux, le caryotype peut donc présenter un intérêt diagnostique (anomalie spécifique), pronostique (certaines formules chromosomiques sont associées à des évolutions favorables ou défavorables) et thérapeutique (évaluation de la maladie résiduelle).

Quand demander un examen en cytogénétique moléculaire ?

Voir [chapitre 7, « Cytogénétique moléculaire »](#).

L'utilisation de sondes moléculaires est le plus souvent décidée pour préciser une anomalie découverte ou suspectée sur un caryotype. C'est alors un complément technique proposé par le laboratoire. La FISH est aussi réalisée de première intention pour les syndromes micro-délétionnels, où elle est parfois remplacée par la MLPA ou l'ACPA.

ENTRAÎNEMENT 6 QCM-QCS

QCM 1

Les techniques de bandes :

- A. Permettent de reconnaître et de classer les chromosomes
- B. Sont toujours lues par un microscope en fluorescence
- C. Les bandes R donnent un marquage inverse des bandes G
- D. La résolution est le nombre de bandes identifiées sur le lot haploïde des chromosomes

QCM 2

- A. Le caryotype conventionnel est réalisé sur des cellules en culture
- B. Le caryotype conventionnel peut être effectué sur des cellules congelées
- C. Les cellules du sang circulant utilisées pour le caryotype constitutionnel se divisent spontanément
- D. La culture des lymphocytes du sang circulant demande l'adjonction de phytohémagglutinine

QCM 3

Les duplications d'un segment de chromosome :

- A. Sont toujours directes
- B. Peuvent être inversées
- C. Peuvent être associées à un remaniement sur un autre chromosome
- D. Font partie des anomalies de nombre

QCM 4

Les délétions :

- A. Peuvent être distales
- B. Sont toujours interstitielles
- C. Peuvent être générées par la présence de séquences répétées sur le génome
- D. Sont plus souvent symptomatiques que les duplications

QCM 5

Les translocations robertsoniennes (Trob) :

- A. Les sujets porteurs sains de Trob ont un caryotype à 45 chromosomes
- B. Il y a six possibilités de formation de gamètes pour un parent porteur d'une Trob
- C. Les Trob sont des échanges entre les extrémités distales des bras q (longs) des chromosomes acrocentriques
- D. Les Trob résultent de la fusion des chromosomes 13, 14, 15, 21 ou 22

QCM 6

- A. Les anomalies de structure peuvent être équilibrées
- B. Les anomalies de structure surviennent toujours *de novo*
- C. Les anomalies de structure peuvent se transmettre sur un mode déséquilibré
- D. Les anomalies de structure ne concernent toujours qu'une paire chromosomique

QCS 1

Les translocations réciproques :

- A. Les translocations réciproques sont toujours équilibrées
- B. Les sujets sains porteurs de translocations réciproques ont un caryotype à 46 chromosomes
- C. Les sujets sains porteurs de translocations réciproques équilibrées n'ont pas de risque pour la descendance
- D. Les translocations réciproques forment toujours des bivalents lors de la méiose

QCS 2

- A. Les trisomies concernent toujours le chromosome 21
- B. Les trisomies sont parfois partielles
- C. Les trisomies sont toujours libres (un chromosome surnuméraire)
- D. Les trisomies surviennent toujours *de novo*

Cytogénétique moléculaire

Valérie Malan, Serge Romana

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	76
Cytogénétique moléculaire, aspects techniques	76
L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH-array	79
Cytogénétique moléculaire, applications cliniques	80
Conclusion : la nouvelle cytogénétique	84

Introduction

La cytogénétique médicale est en pleine révolution. Le caryotype mis au point en 1956, n'est désormais plus l'examen de première intention pour l'exploration des anomalies chromosomiques associées à une déficience intellectuelle et/ou aux malformations congénitales (DI et/ou MC). Il est aujourd'hui supplanté par l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) qui est l'aboutissement du développement des techniques de cytogénétique moléculaire dont le début remonte aux années 1980. L'ACPA détecte des déséquilibres génomiques avec une résolution 10 à 1000 fois supérieure à celle du caryotype (qui est de 5 à 10 millions de paires de bases ou 5–10 Mb). De ce fait, la taille et la localisation d'un segment chromosomique remanié peuvent être déterminées avec précision ce qui permet de connaître son contenu génique et donc de faciliter l'établissement des corrélations phénotype-génotype. La détection d'une perte ou d'un gain de matériel chromosomique chez des patients présentant une DI et/ou des MC ainsi que des pathologies neuropsychiatriques permet dans certains cas d'identifier le(s) gène(s) impliqué(s). Avec l'avènement de cette technique, le cytogénéticien « constitutionnaliste » devient un « interniste » de la pathologie génomique.

Dans les cancers et en particulier dans les hémopathies malignes, l'impact de l'ACPA pour le diagnostic des anomalies chromosomiques est plus limité. En effet, les anomalies chromosomiques qui leur sont associées sont, d'une part, souvent équilibrées et seules certaines d'entre elles sont recherchées pour le traitement. De ce fait, la FISH (qui est une technique de cytogénétique ciblée) et la RT-PCR restent les examens moléculaires de choix, avec le caryotype, pour le diagnostic en routine des anomalies présentes dans ces pathologies.

Par ailleurs, sur le plan de la recherche, l'ACPA est un outil précieux pour l'identification de gènes impliqués dans des pathologies constitutionnelles et acquises.

Dans ce chapitre, nous exposerons dans un premier temps les bases techniques des principaux outils de la cytogénétique moléculaire utilisés en routine dans les laboratoires de cytogénétique, puis nous présenterons les principales applications de ces techniques. Enfin, nous terminerons sur une réflexion concernant l'avenir de la cytogénétique.

Cytogénétique moléculaire, aspects techniques

L'hybridation *in situ* fluorescente ou FISH (pour *fluorescence in situ hybridization*)

Un peu d'histoire

La toute première technique de cytogénétique moléculaire s'appelle l'hybridation *in situ* fluorescente. Elle repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN. Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les deux brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier de façon spécifique (étape appelée « renaturation »). En 1981, l'équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (du dUTP) couplé à de la biotine dans un fragment d'ADN (cette opération s'appelle le « marquage ») qui est alors appelé « sonde ». Dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées, la sonde est révélée par des anticorps antibiotine couplés à un fluorochrome, le FITC. Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde. Ainsi naquit l'hybridation *in situ* fluorescente, permettant l'observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme *in situ* (à la différence du *Southern blot* qui est l'hybridation d'une sonde sur de l'ADN fixé sur une membrane de nylon) [1]. L'utilisation de plusieurs fluorochromes et de filtres microscopiques idoines ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d'hybrider plusieurs sondes de façon concomitante. Grâce à ces progrès, il est possible aujourd'hui d'étudier de façon simultanée plus de 20 loci sur des chromosomes.

Les sondes

Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome. Pour la FISH, on utilise des sondes spécifiques de régions chromo-

somiques ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée.

On distingue :

- les sondes composées de séquences spécifiques d'ADN répété. Elles sont de petite taille (moins de 1 000 paires de bases ou 1 kilobase [kb]), mais s'hybrident sur des séquences spécifiques (centromères par exemple) répétées en tandem sur plusieurs centaines de kb. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité (e-figure 7.1A);
- les sondes composées de séquences uniques. On distingue les sondes spécifiques de loci et les sondes spécifiques d'un bras chromosomique ou d'un chromosome entier (e-figure 7.1B et 7.1C);
- les sondes spécifiques de loci. Pour être entièrement séquencé, le génome humain fut fragmenté en segments de 100–200 kb puis clonés dans des vecteurs appelés BAC (pour *bacterial artificial chromosome*, chromosomes artificiels de bactéries). Ces BAC sont aujourd'hui utilisés comme sondes pour la technique de FISH. Le choix du BAC se fait par l'intermédiaire de sites Internet publics donnant leur position précise sur le génome humain (UCSC : <https://genome.ucsc.edu>; Ensembl : www.ensembl.org; *Database of Genomic Variants* : projects.tcag.ca/variation). D'autres vecteurs peuvent être également utilisés comme sondes (fosmides, cosmides, phages, plasmides ou chromosomes artificiels de levure [YAC, pour *yeast artificial chromosomes*]);
- les sondes de peinture chromosomique. Par PCR à partir d'ADN de lignées d'hybrides somatiques contenant chacune un exemplaire d'une paire de chromosome humain ou de chromosomes obtenus par cytométrie de flux, il est possible d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN représentant un chromosome en entier. Ces fragments marqués vont s'hybrider sur une paire chromosomique donnée. L'ensemble de ces fragments s'appelle « sonde de peinture chromosomique » [2].

Le marquage

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN. Au début des années 1980, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplés aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (subs-

tance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des fluorochromes. Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connus sont le *random priming* et la *nick translation*.

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}), et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission.

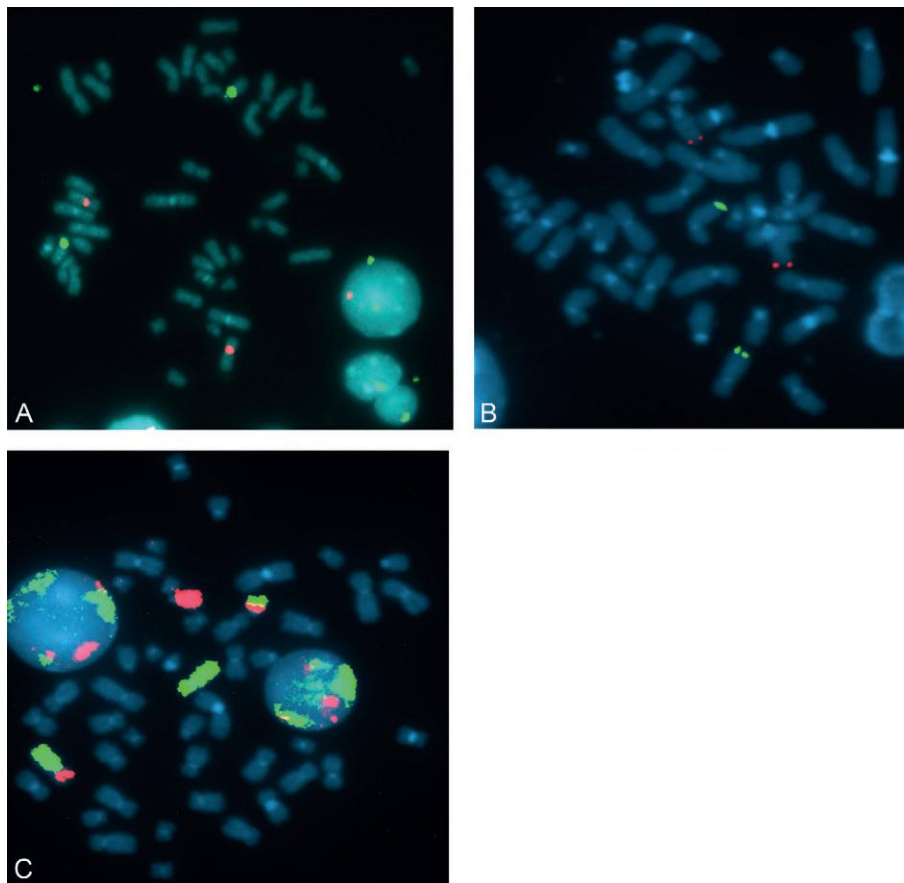
Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310 nm–372 nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer;
- le FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (λ_{exc} 495 nm– λ_{em} 519 nm) fluoresce dans le vert;
- la cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495 nm– λ_{em} 519 nm) fluoresce dans l'orange;
- le *Texas red* (λ_{exc} 589 nm– λ_{em} 615 nm) fluoresce dans le rouge;
- la cyanine 5 (λ_{exc} 650 nm– λ_{em} 670 nm) fluoresce dans l'infra-rouge;
- la cyanine 5,5 (λ_{exc} 675 nm– λ_{em} 694 nm) fluoresce dans l'infra-rouge.

La multifuorescence

La FISH offre la possibilité d'étudier plusieurs loci simultanément lors d'une seule hybridation. Il suffit pour cela d'hybrider des sondes marquées avec des fluorochromes différents dont les spectres d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas.

Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes. On obtient alors une sonde dont la fluorescence est complexe, composée des longueurs d'émission des différents fluorochromes. Le signal de ce type de sonde ne peut être analysé qu'après numérisation. En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes



e-figure 7.1

Les sondes.

A. *Sondes centromériques :*

- en rouge : sonde centromérique du chromosome 8;
- en vert : sonde centromérique du chromosome 17.

B. *Sondes spécifiques de loci :*

- en rouge : sonde télomérique du chromosome 12;
- en vert : sonde télomérique du chromosome 8.

C. *Sondes de peintures chromosomiques :*

- en vert : sonde de peinture du chromosome 10;
- en rouge : sonde de peinture du chromosome 13.

La FISH pratiquée avec ces deux sondes de peintures chromosomiques détecte une translocation réciproque (10, 13).

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.

de peinture, chacune spécifique d'une paire chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multi-fluorescence (e-figure 7.2A). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère (e-figure 7.2B et 7.2C).

L'hybridation (e-figure 7.3)

C'est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Son efficacité dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d'hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, à 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

Dans la grande majorité des cas, l'hybridation est dite « compétitive ». En effet, l'ADN est composé de 45 % de séquences répétées et de 65 % de séquences uniques, ce qui correspond à la composition des sondes (à l'exception des sondes centromériques et télomériques). Après marquage, ces séquences répétées vont s'hybrider sur leurs cibles génomiques engendrant des signaux aspécifiques. Pour les éviter, Lengoer *et al.*, en 1986, ont eu l'idée d'ajouter à l'ADN de la sonde un excès d'ADN non marqué riche en séquences répétées (appelé aujourd'hui ADN Cot1). Ainsi cet ADN s'hybride non seulement sur les séquences répétées de la sonde mais aussi sur celles des cibles génomiques. Cette méthode, appelée hybridation « compétitive », permet d'éviter les signaux aspécifiques [3].

La microscopie en épifluorescence

Principe général

 La e-figure 7.4 illustre la microscopie en épifluorescence. Un rayon lumineux de lumière blanche (contenant l'ensemble des longueurs d'onde de l'ultraviolet aux infrarouges) est généré par des lampes à mercure (donnant des pics d'intensité dans les longueurs d'onde du visible) ou à xénon (pics d'intensité homogène pour toutes les longueurs d'onde). Cette lumière est transmise au niveau d'un dispositif contenant deux filtres et un miroir dichroïque. Le premier filtre sélectionne une longueur d'onde d'excitation (correspondant à celle du fluorochrome intégré dans la sonde d'intérêt) qui est ensuite réfléchi par le miroir dichroïque sur la lame hybridée. Une fois le fluorochrome excité, il émet une

longueur d'onde d'émission, d'intensité plus faible, qui peut alors passer à travers le miroir dichroïque pour arriver ensuite au filtre d'émission de façon à éliminer des longueurs d'onde parasites. Cette longueur d'onde d'émission est par la suite transmise aux oculaires du microscope pour être observée par l'œil de l'observateur ou à une caméra qui numérise ce signal. En changeant de filtres, on peut alors étudier de cette façon plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents.

La multifuorescence

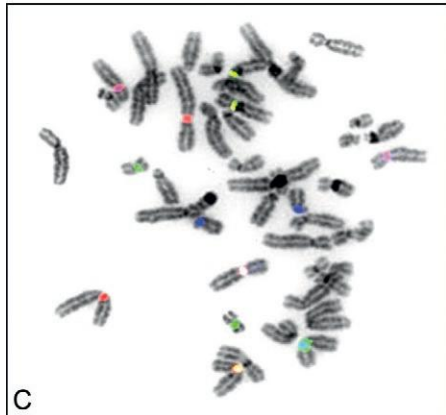
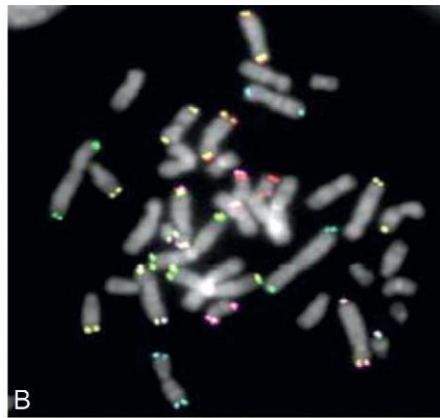
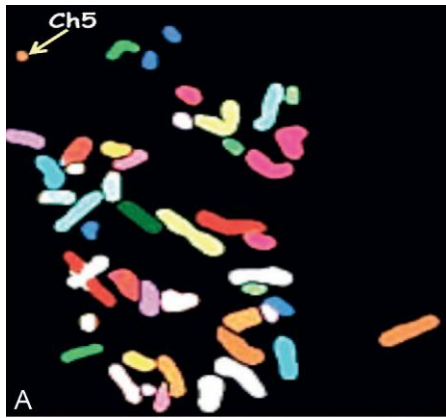
La possibilité de marquer des sondes avec plusieurs fluorochromes, le développement des caméras permettant la numérisation des signaux et la mise au point de différents logiciels d'analyse des signaux ont permis le développement du caryotype en multifuorescence.

Deux procédés sont utilisés :

- le premier repose sur la numérisation successive par la caméra des différents signaux émis par les sondes hybridées. Souvent, la première image capturée est celle générée par le DAPI. La superposition de l'ensemble des signaux sur un écran d'ordinateurs permettra d'étudier précisément les loci correspondant aux sondes hybridées. En utilisant 23 sondes de peinture avec un logiciel ayant intégré les combinaisons des fluorochromes spécifiques de chaque paire chromosomiques, Speicher *et al.* (1996) ont été capables d'établir un caryotype en multifuorescence en classant des chromosomes d'après leur fluorescence spécifique [4];
- le deuxième procédé repose sur l'analyse spectrale des signaux. C'est une méthode d'analyse des signaux plus complexe qui nécessite un interféromètre dont le rôle est de décomposer et d'analyser, en un seul temps, le contenu en longueurs d'onde d'une lumière complexe. Ce procédé fut décrit en 1996 par l'équipe de Schrock *et al.* [5].

La limite de la technique de FISH

La FISH avec des sondes spécifiques de loci est une technique d'étude ciblée, à la différence du caryotype qui permet d'explorer l'ensemble du génome. La FISH avec les sondes de peinture a une résolution de 1,5 Mb pour la détection des translocations télomériques. En cas d'insertion chromosomique, elles ne permettent pas de déterminer la région chromosomique impliquée. Enfin, elles ne sont pas d'une grande utilité pour la détection des délétions.



e-figure 7.2

La multifuorescence.

A. Hybridation de 24 sondes de peintures chromosomiques révélée par analyse spectrale.

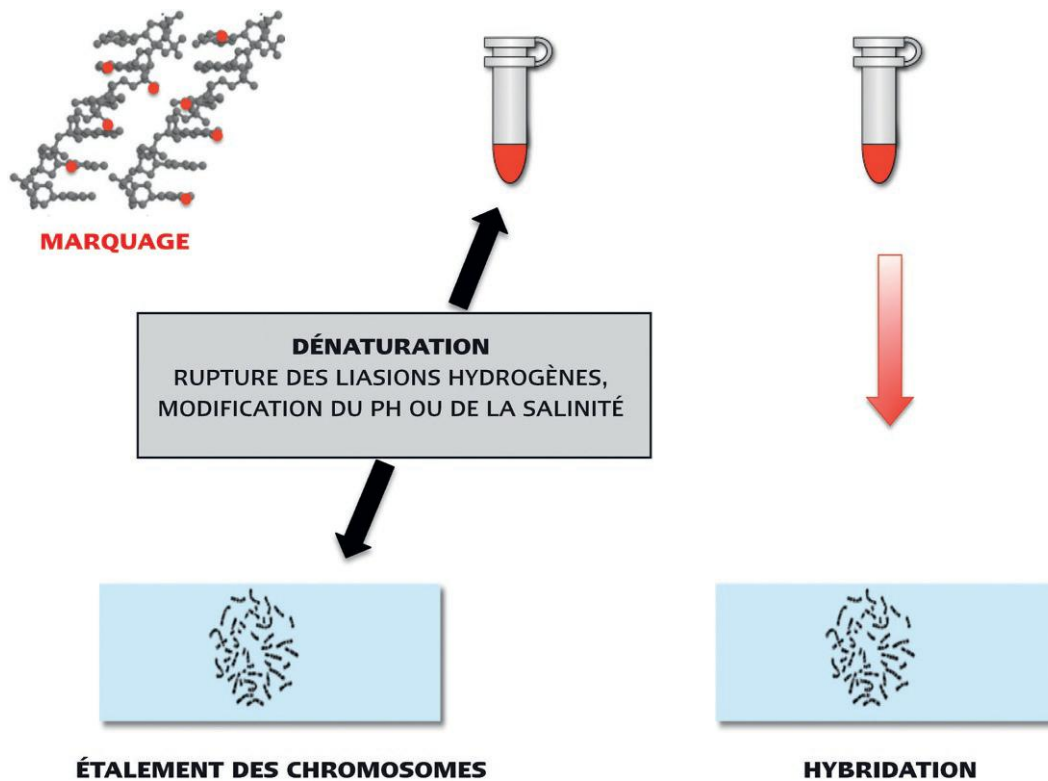
Caractérisation de l'origine (chromosome 5) d'un petit marqueur.

B. Hybridation de 12 sondes spécifiques des régions pseudotélomériques de 12 chromosomes.

Dans ce dispositif, un autre lot de 12 sondes correspondant aux autres chromosomes est hybridé sur une autre plage de la lame. Les extrémités de tous les chromosomes sont analysées avec ce procédé (Mega-Telomeric Probes, Necker-Enfants malades).

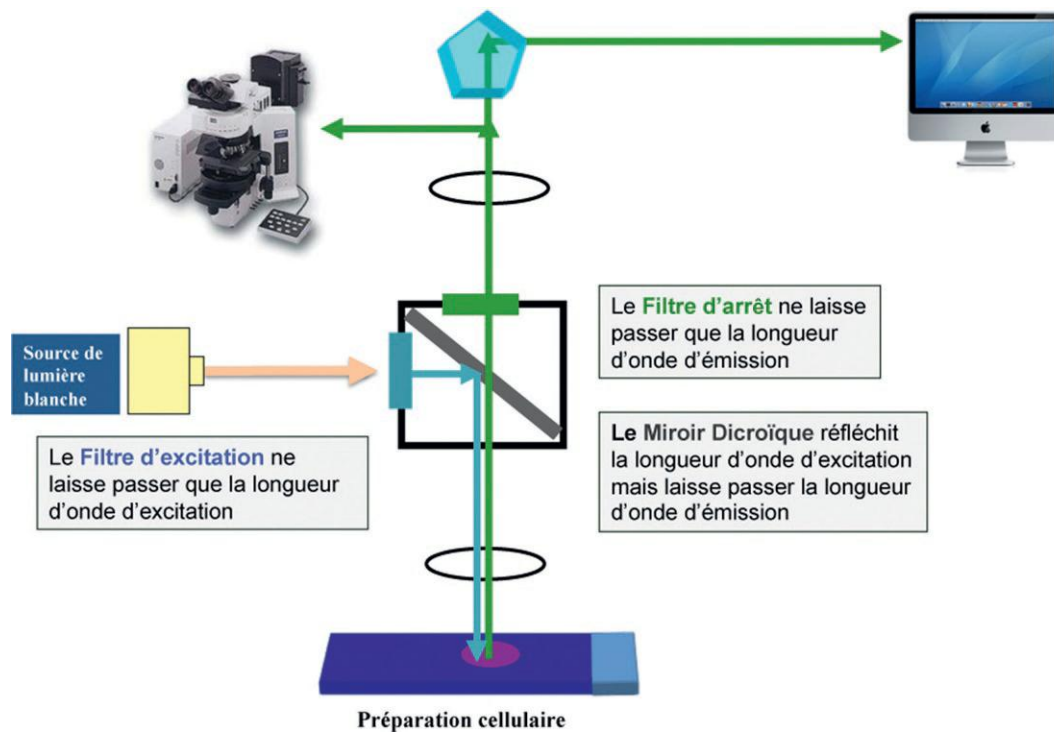
C. Hybridation d'un des lots du système M-centromère (M-Cen : Necker-Enfants malades).

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.



e-figure 7.3

Principe de l'hybridation *in situ* fluorescente.



e-figure 7.4

Microscopie en fluorescence.

L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH-array

Un peu d'histoire

En 1992, l'équipe de Dan Pinkel mit au point une nouvelle technique de cytogénétique appelée hybridation génomique comparative (CGH, pour *comparative genomic hybridization*) [6]. Le principe est de comparer le nombre de molécules d'une même quantité d'ADN de deux individus en les marquant chacune par un fluorochrome différent puis en les hybridant ensemble sur des métaphases d'un témoin. Après l'étape d'hybridation, les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés et un rapport de leur intensité respective – patient sur témoin (reflétant le rapport du nombre de molécule d'ADN du patient par rapport à celle du témoin) – est établi au niveau des bandes de chacune des paires chromosomiques. Le ratio d'intensité des deux fluorochromes au niveau d'une bande aura une valeur théorique proche de 1 si le nombre de molécules des deux génomes est identique au niveau de la bande observée. En cas de délétion, ce rapport théorique sera de 0,5 et de 1,5 en cas de trisomie (e-figure 7.5). Une des limites de la CGH sur métaphases, est de ne détecter que des déséquilibres génomiques. Les anomalies chromosomiques équilibrées et les anomalies en faible mosaïque ne sont pas mises en évidence.

Ainsi, cette technique a permis de s'extraire de l'analyse morphologique des chromosomes d'un patient en analysant son contenu global en ADN. Mais la résolution de la CGH sur métaphases reste celle de la bande chromosomique (5–10 Mb), car le ratio d'intensité des fluorochromes est établi au niveau de chaque bande chromosomique.

Vers la fin des années 1990, Solinas-Toldo [7] et Pinkel *et al.* [8] proposèrent une autre technique de CGH sur des lames sur lesquelles sont fixés des fragments d'ADN. Il s'agit de la CGH sur réseau d'ADN ou CGH-array!

Principe

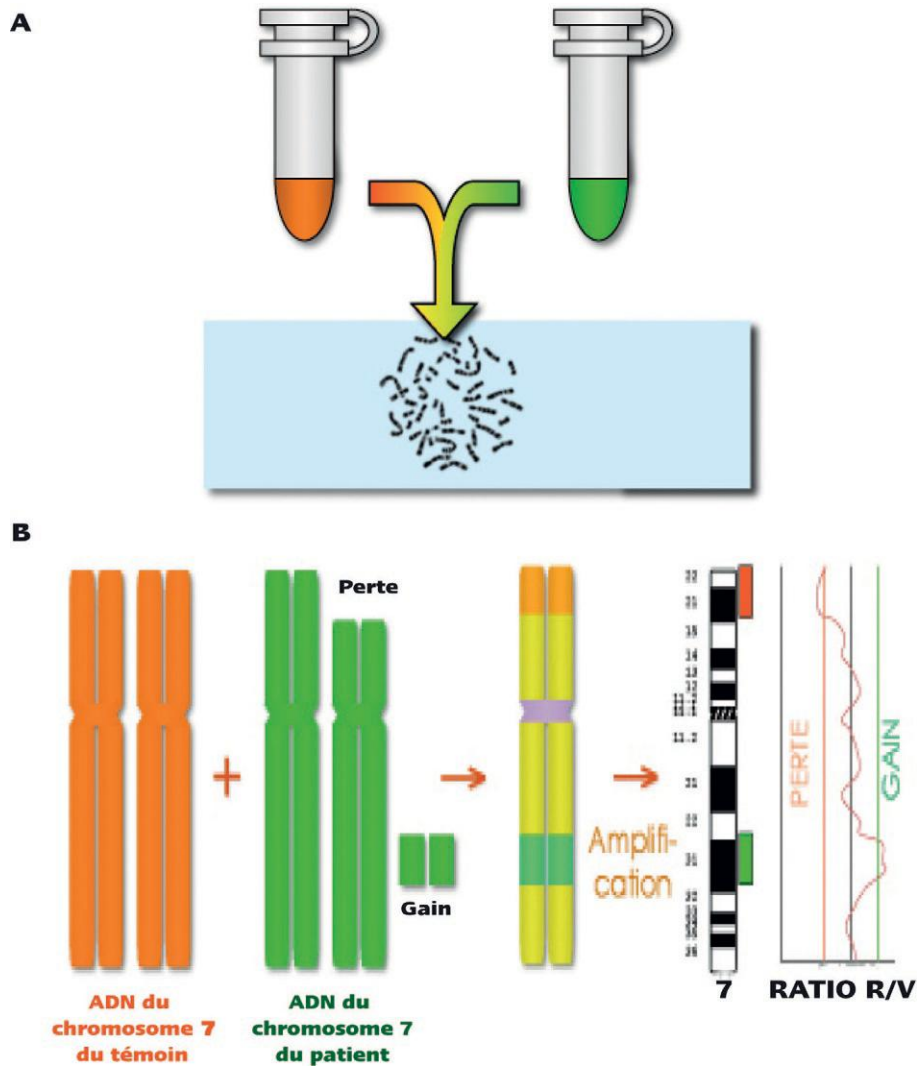
À la fin des années 1990, Solinas-Toldo et Pinkel démontrèrent qu'il était possible d'effectuer une CGH sur des fragments d'ADN fixés sur des lames de verre. Très rapidement, avec le séquençage du génome, il fut possible de fixer sur ces lames des séquences génomiques, appelées

« sondes », représentant une partie plus ou moins importante du génome. Ces lames furent appelées « puce à ADN » ou *microarray*. Comme pour la CGH sur métaphases, une même quantité d'ADN témoin et d'ADN patient marquée par deux fluorochromes différents (ce mélange est appelé « cible ») est déposée sur la lame. Le rapport d'intensité de fluorescence est calculé au niveau de chaque fragment d'ADN fixé (appelé « sonde »). Un traitement statistique des données est ensuite réalisé grâce à des logiciels dédiés. Les résultats sont donnés sous forme graphique où un « point » correspond à la valeur du ratio d'intensité de fluorescence au niveau d'une sonde (e-figure 7.6). L'ensemble des « points » est placé sur des idéogrammes de chaque chromosome. À la différence de la CGH sur métaphases, l'existence d'un déséquilibre génomique sera objectivée par une déviation du ratio d'intensité de fluorescence non plus au niveau d'une bande chromosomique, mais au niveau des sondes fixées sur la lame. De leur nombre et de leur localisation sur le génome dépendra la résolution de la puce utilisée.

Les premières « puces pangénomiques » (représentant l'ensemble du génome) furent construites avec 3 000 clones BAC/PAC dont la localisation correspondait à des loci espacés toutes les mégabases. Le génome étant d'une taille de 3 milliards de paires de base, ces puces avaient une résolution moyenne d'une mégabase, soit 5 fois supérieure à celle d'un caryotype en haute résolution. Ishkanian *et al.* [9], en utilisant 32 433 BAC chevauchants sur tout le génome, ont pu obtenir une puce d'une résolution de l'ordre de 30 kb.

Au milieu des années 2000, les puces à oligonucléotides firent leur apparition. Il s'agit de lames sur lesquelles sont fixés des oligonucléotides simples brins d'environ 60–80 bases (ou « mer ») qui peuvent être déposés ou directement synthétisés dessus. Le nombre d'oligonucléotides peut atteindre plusieurs millions, ce qui permet d'obtenir une résolution de quelques centaines de paires de bases. Ces lames sont aujourd'hui commercialisées par de nombreuses compagnies.

La CGH-array permet la détection de déséquilibres chromosomiques dont la taille varie avec la résolution de la puce utilisée. La CGH étant une comparaison de nombre de molécules d'ADN d'un individu par rapport à un autre, un déséquilibre génomique de plus de 1 kb détecté par cette technique a été appelé CNV pour *copy number variation*, en français : variation de nombre de copies.



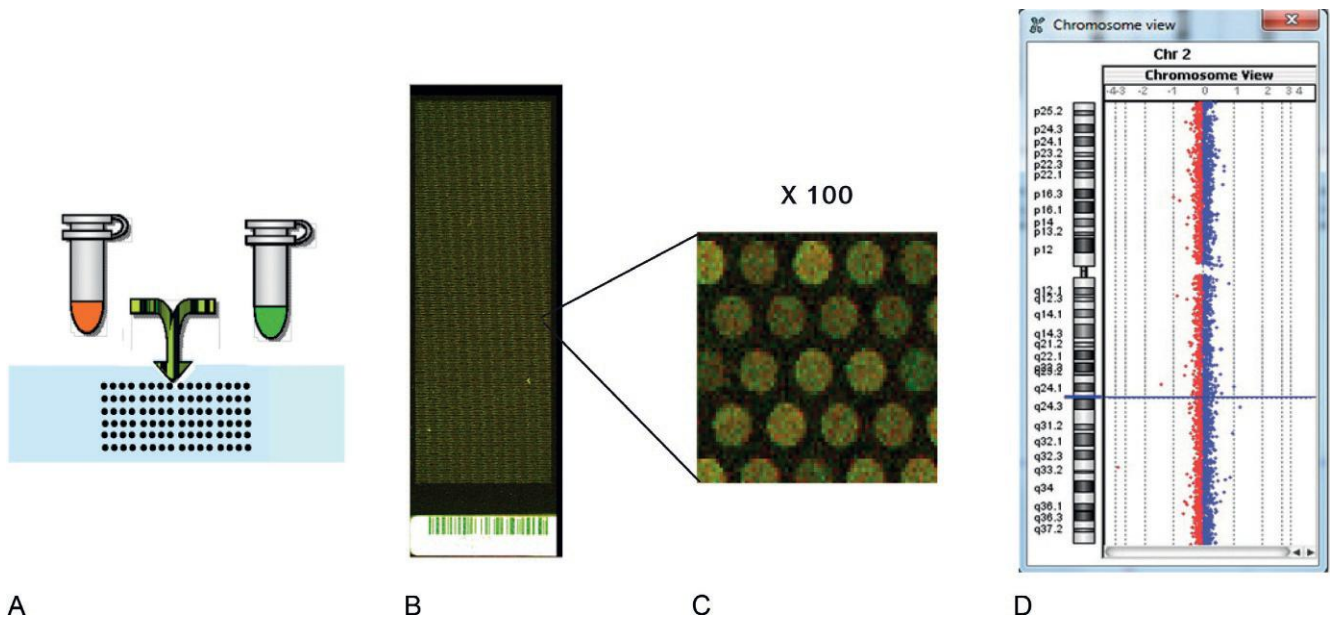
e-figure 7.5

Principe de la CGH sur chromosome.**A. Principe de CGH-array sur chromosome.**

Une quantité d'ADN d'un patient est marquée avec un fluorochrome (symbolisé par la couleur verte). La même quantité d'ADN d'un témoin est marquée avec un fluorochrome différent (symbolisé par la couleur rouge-jaune). Le tout est mélangé et hybridé sur une lame sur laquelle ont été étalés des chromosomes d'un témoin.

B. Interprétation d'une CGH-array sur chromosome.

Après hybridation, l'intensité de la fluorescence des deux sondes est numérisée le long de l'axe longitudinal de chaque paire chromosomique et un rapport d'intensité des deux fluorescences est établi après traitement informatique des données. Ce rapport est objectivé sous forme d'une ligne le long d'un idéogramme chromosomique. Les valeurs sont données en logarithme de base 2. De ce fait, la valeur 0 représente l'égalité parfaite entre les intensités des deux fluorescences. On considère qu'il y a une perte d'une région si les valeurs d'intensité au niveau de cette région sont inférieures à 0,80 et un gain si les valeurs sont supérieures à 1,25.



e-figure 7.6

Principe de la CGH-array.

A. La sonde est préparée à partir d'une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin (comme pour la CGH sur chromosome). Le mélange est hybridé sur des lames sur lesquelles sont fixées des sondes BAC, PAC ou des oligonucléotides. B. Hybridation sur une lame sur laquelle ont été fixés 244 000 oligonucléotides de 60 mers, soit environ 1 nucléotide choisi tous les 10 000 paires de base du génome. C. Grossissement d'un secteur de la lame d'une magnitude de 100. Chaque spot fluorescent est le résultat de l'hybridation de la sonde au niveau de milliers d'oligonucléotides ayant la même séquence et fixés au niveau du spot. D. Une valeur moyenne du rapport de fluorescence est établie pour chaque spot d'oligonucléotides. L'ensemble des valeurs est rapporté en regard d'un idéogramme chromosomique. Chaque point représente la valeur du rapport entre les deux fluorescences au niveau des spots. Un point bleu signifie que la valeur du rapport de fluorescence est supérieure à 0; un point rouge que ce rapport est inférieur à 0 (log base 2). Les valeurs normales sont comprises entre -1 et 0,5. Ici, on considère qu'il n'y a pas de déséquilibre au niveau du chromosome 2 (les points qui sont en dehors de ces valeurs sont des artéfacts).

Images : hôpital Necker-Enfants malades.

Une variante : les puces à SNP (e-figure 7.7)

Il est possible de fixer sur les lames des oligonucléotides contenant des *single nucleotide polymorphisms* ou SNP. Ce sont des variations portant sur une seule paire de base et distribuées uniformément dans le génome humain. On estime le nombre de SNP à plus de 10 millions avec une répartition d'un SNP tous les 100 à 1000 paires de bases (1 kb). La carte des SNP étant établie, différents procédés ont été mis au point pour synthétiser des oligonucléotides contenant pour un locus donné les deux allèles du SNP. L'avantage de l'utilisation de ces puces dites « puces à SNP » est de pouvoir détecter les situations d'isodisomies uniparentales (perte d'hétérozygotie) et de déterminer l'origine parentale d'un remaniement (avec l'étude des parents). Pour la plupart des sondes, l'hybridation s'effectuera sur les deux allèles. En cas de perte d'hétérozygotie, un seul allèle sera détecté.

Ces puces ont initialement été développées à des fins d'haplotypage et d'analyse de liaison. Cependant, elles peuvent donner également une information sur le nombre de copies d'ADN aux loci étudiés.

Ces deux techniques sont aujourd'hui totalement automatisables et permettent de ce fait l'étude des déséquilibres génomiques à haut débit. L'acronyme ACPA qui signifie « analyse chromosomique sur puces à ADN » (acronyme choisi par le réseau français AChro-Puce, www.renapa.univ-montp1.fr) désigne aussi bien la technique de CGH-array que celle des puces à SNP.

Cytogénétique moléculaire, applications cliniques

La FISH

Le caryotype est resté pendant plus de 50 ans le seul examen d'étude globale du génome. Il a été déterminant pour le diagnostic et la prise en charge de nombreuses pathologies constitutionnelles et acquises, notamment dans les hémopathies malignes (nosologie et choix thérapeutique). Ses principales limites sont sa résolution (au maximum 5 millions de paires de bases, 5 Mb), la difficulté de caractériser certaines anomalies (les bandes noires, grises ou blanches de différents chromosomes se ressemblent respectivement), la nécessité d'obtenir des mitoses et l'impossibilité d'établir un rapport phénotype-génotype moléculaire. L'utilisation de

la FISH sur des métaphases et sur des noyaux a permis de dépasser certaines de ces limites.

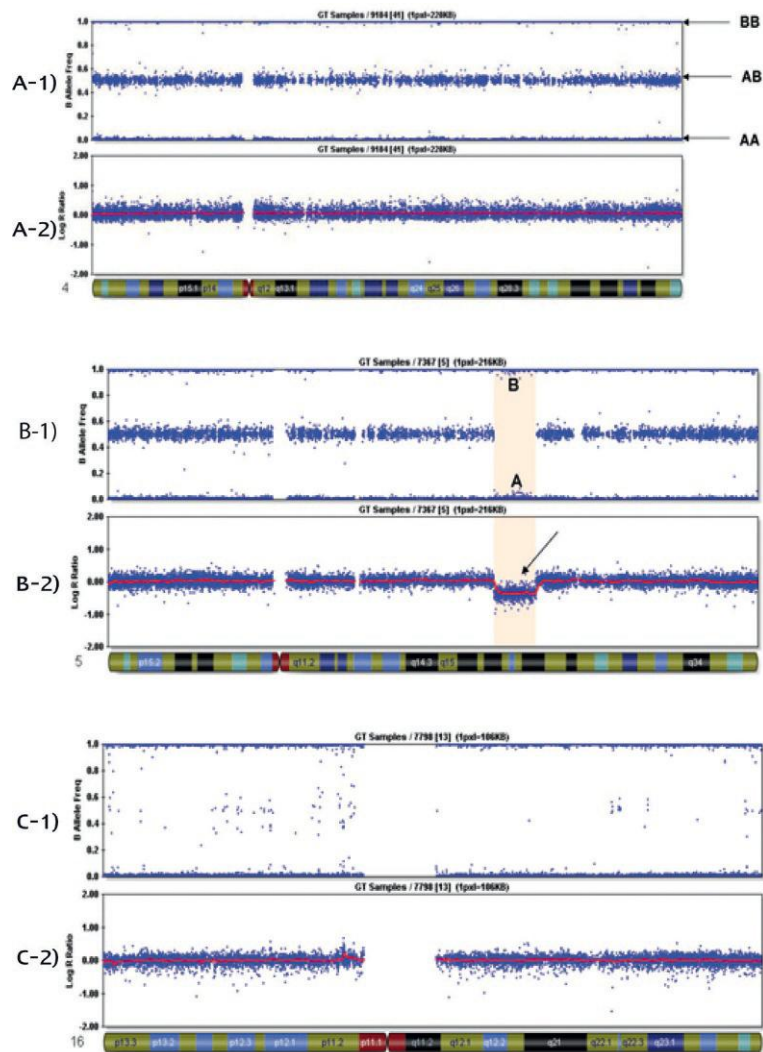
La FISH sur métaphase : un complément du caryotype

Le diagnostic cytogénétique des syndromes microdélétionnels

Les syndromes microdélétionnels sont liés à des pertes de fragments chromosomiques d'une taille en général comprise entre 500 000 paires de bases (500 kb) et 4 000 000 de paires de bases (4 Mb), non décelables dans l'immense majorité d'entre eux par les techniques de bandes. La cause chromosomique de la plupart de ces syndromes individualisés cliniquement dans les années 1960 a pu être identifiée grâce à la découverte de translocations ou autres remaniements visibles sur le caryotype standard permettant de cibler une région précise¹. Lorsque le tableau clinique est évocateur, il est possible d'établir leur diagnostic par FISH, avec une sonde spécifique.

L'exemple le plus connu est celui du syndrome de DiGeorge/vélo-cardio-facial (DG/VCF) (e-figure 7.8A), correspondant à une délétion d'environ 3 Mb dans la sous-bande 22q11.21 (ou plus rarement à des plus petites délétions de 1,5 Mb). Il existe aujourd'hui une cinquantaine de syndromes microdélétionnels [10]. Cependant, la variabilité phénotypique et l'absence de spécificité clinique de certains de ces syndromes sont à l'origine d'une valeur prédictive positive faible des examens de FISH ciblés. À titre d'exemple, dans notre expérience, seulement 7 % des études FISH réalisées pour rechercher une délétion 22q11.21

1. La récurrence de certains de ces remaniements est liée à l'architecture du génome car ils sont médiés par des structures génomiques appelées « duplications segmentaires » ou LCR (*low copy repeats*). Ces répétitions segmentaires correspondent à des séquences d'ADN de 10 kb à 400 kb de longueur, présentes en plusieurs copies dans le génome, espacées de 500 kb à 4 Mb et ayant une grande homologie de séquence (95–99 %). Elles sont particulièrement présentes dans les régions centromériques et télomériques. Lors de la méiose, la grande homologie de séquence de ces blocs d'ADN favorise les recombinaisons homologues non-alléliques (NAHR, pour *non-allelic homologous recombination*). Ainsi, la région comprise entre deux duplications segmentaires de même orientation sera délétée ou dupliquée suite à cette recombinaison illégitime. Lorsque ce mécanisme est à l'origine d'un déséquilibre chromosomique, la taille du segment remanié est toujours identique entre les patients et les points de cassure se situent dans les duplications segmentaires. Ces remaniements sont appelés « désordres génomiques », terme introduit par Lupski en 1998 pour désigner les remaniements chromosomiques récurrents liés à des particularités de l'architecture du génome.



e-figure 7.7

Principe de la SNP-array.

A-1. *SNP-array normale, représentation des haplotypes.* La ligne supérieure représente les haplotypes BB, la ligne du bas, les haplotypes AA et celle du milieu, les haplotypes AB des différents SNP d'un chromosome du patient.

A-2. *SNP-array normale, représentation du nombre de copies.* Toutes les valeurs sont comprises entre -1 et 0,5.

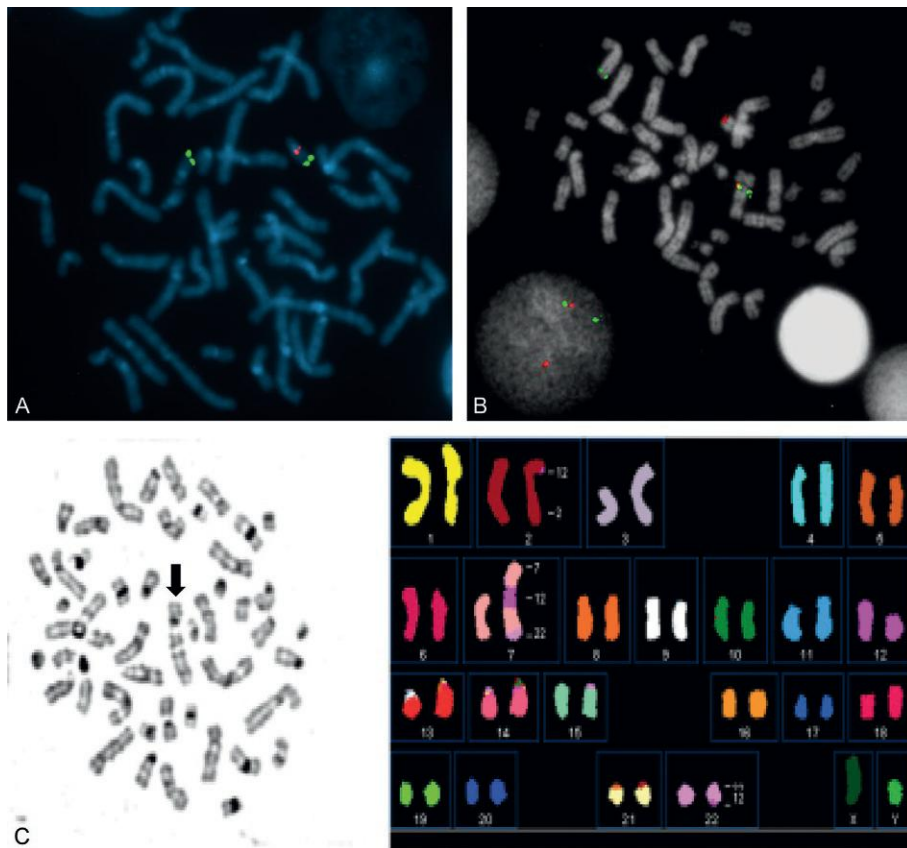
B-1. *Délétion détectée par SNP-array.* La délétion entraîne une perte d'hétérozygotie. Le patient a, dans la région délétée, l'haplotype A ou B.

B-2. *Délétion détectée par SNP-array.* La ligne rouge représentant la moyenne du rapport de fluorescence montre un rapport de fluorescence d'une valeur de -1 au niveau de la zone délétée.

C-1. *Isodisomie du chromosome 16 détectée par SNP-array.* Le patient n'a pas d'haplotype AB sur tout le chromosome 16. Il y a une perte d'hétérozygotie sur tout le chromosome 16.

C-2. *Isodisomie du chromosome 16 détectée par SNP-array.* Il n'y a pas de perte de nombre de copies sur tout le chromosome 16.

Images : Dr Boris Keren, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris.



e-figure 7.8

FISH sur métaphases.

A. Détection par FISH d'une délétion 22q11.21 associée au syndrome DG/VCF. Le signal vert est généré par une sonde télomérique du chromosome 22 (sonde contrôle). Le signal rouge est généré par une sonde de la région testée en 22q11.21. Chez ce patient, il n'y a qu'un seul signal rouge.

B. Détection d'un remaniement du gène MLL. Sur le chromosome 11 non remanié, les deux sondes couvrant le locus du gène MLL génèrent un signal coalescent. Chez ce patient, il existe une translocation impliquant le chromosome 11 avec un point de cassure localisé dans le gène MLL entre les deux sondes. De ce fait, les signaux sont séparés : le signal rouge reste sur le der (11) et le signal vert se localise sur l'autre chromosome dérivé.

Notez que le noyau interphasique, un couple de signaux est coalescent (chromosome 11 non remanié) et l'autre est séparé, indiquant ainsi le remaniement de MLL.

C. Caractérisation par analyse spectrale de remaniements chromosomiques complexes dans une leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant.

- À gauche, une métaphase de lymphoblastes, la flèche indique un marqueur chromosomique.
- À droite, le caryotype « multicolore » établi par analyse spectrale. Notez dans la case du chromosome 7 que le marqueur est composé de chromosome 7, puis de chromosome 12 suivi de chromosome 7 avec dans la région terminale du bras long, du chromosome 22. Notez aussi l'existence d'autres anomalies : une translocation t(2;12) et une translocation t(12;21) non détectable par des techniques de bandes.

sont positives et 0,5 % pour la délétion 22q13 (qui est associée au syndrome de Phelan-McDermid). En revanche, la recherche par FISH de la délétion 7q11.23 associée au syndrome de Williams est positive dans 50 % des cas en raison de signes cliniques très évocateurs dans cette pathologie.

Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes

La majorité des anomalies chromosomiques de structure impliquées dans la pathogenèse des leucémies et des lymphomes sont clonales, récurrentes, non aléatoires et souvent spécifiques d'un type d'hémopathies malignes. Il s'agit souvent de translocations équilibrées qui entraînent une recombinaison de deux gènes au point de cassure. Il y a donc formation d'un « gène de fusion » codant une protéine chimérique à l'origine de la prolifération maligne. Le diagnostic par FISH de ces remaniements géniques est réalisé par l'utilisation de sondes spécifiques du locus ou des gènes impliqués. C'est par exemple le cas des remaniements du gène MLL, gène remanié avec plus de 70 partenaires, localisé en 11q23, qui sont facilement détectés par l'utilisation d'une sonde comme l'indique la [e-figure 7.8B](#).

Caractérisation d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype

Une autre application majeure de la technique de FISH est la caractérisation d'une anomalie chromosomique décelée sur le caryotype. Parfois, l'observation des bandes chromosomiques ne permet pas d'interpréter certains remaniements qu'ils soient complexes ou non. Par exemple, l'origine de petits marqueurs surnuméraires non identifiables par les méthodes classiques peut se faire à l'aide de sondes centromériques. Les sondes de peinture qui marquent la totalité d'un chromosome sont également très utiles pour caractériser ces marqueurs ou d'autres types de remaniements complexes. Dans ces situations, les techniques de multi-fluorescence (SKY ou M-FISH) sont particulièrement indiquées ([e-figure 7.8C](#)).

Détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées

Certaines translocations ne sont pas détectables par les techniques de bandes. C'est le cas lorsque les anomalies sont de petites tailles ou lorsque les segments échangés sont de même taille et même aspect. Les chromosomes

dérivés ressemblent alors à ceux qui ne sont pas remaniés. Dans ces situations, la FISH sur métaphase avec des sondes de peinture ou des sondes télomériques peut être d'un grand intérêt. Ce fut le cas lors de la découverte de la translocation la plus fréquente associée aux leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B de l'enfant : la t(12;21) (p13;q21) [2].

La FISH interphasique

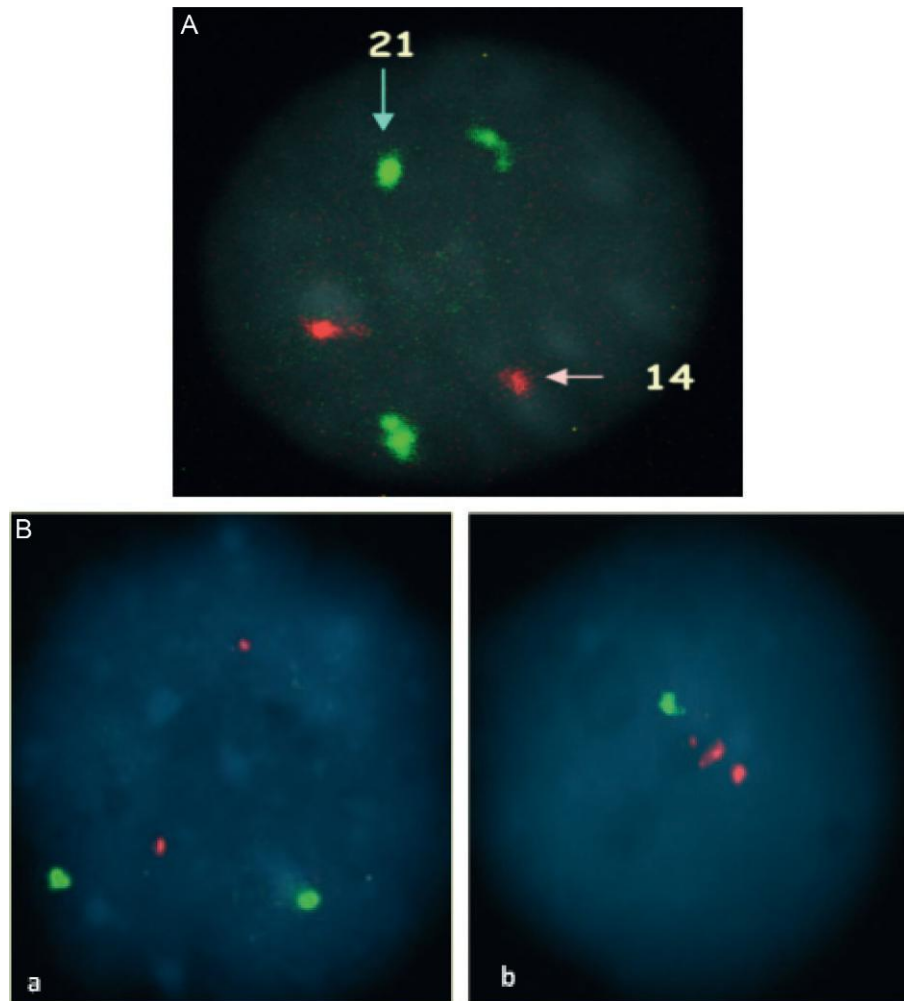
La FISH interphasique est une technique qui s'est rapidement imposée car elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. En effet, les signaux d'hybridation générés par les sondes d'une taille de plus de 150 kb sont visibles sur les noyaux. Un plus grand nombre de cellules (les noyaux sont 10 à 50 fois plus nombreux que les métaphases sur une préparation de cellules cultivées) peut être ainsi étudié. Ses applications concernent la détection d'anomalies chromosomiques associées à des pathologies constitutionnelles ou acquises. Parmi les principales applications, on peut citer le diagnostic prénatal des principales aneuploidies, le diagnostic pré-implantatoire et celui des anomalies chromosomiques associées aux cancers.

Le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques

L'une des applications les plus connues de la FISH interphasique est le diagnostic des trisomies 13, 18 et 21 sur amniocytes non cultivés mise au point dès les années 1994 [11]. À partir de cellules obtenues par ponction de liquide amniotique, l'hybridation de sondes spécifiques de loci des chromosomes 13, 18 et 21 permet en 24 heures, sans attendre 10 à 15 jours de culture, la détection d'une aneuploidie impliquant ces 3 chromosomes ([e-figure 7.9A](#)).

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) des anomalies chromosomiques

L'une des applications les plus spectaculaires de la FISH est certainement le diagnostic préimplantatoire des anomalies chromosomiques [12]. La situation la plus fréquente est celle où l'un des parents est porteur d'une translocation équilibrée (cela concerne 1 couple sur 300). La ségrégation méiotique peut générer des gamètes déséquilibrés à l'origine de trisomies ou de monosomies partielles conduisant, selon l'importance du déséquilibre génomique, à des fausses couches spontanées, des morts fœtales *in utero* ou



e-figure 7.9

La FISH interphasique.

A. Diagnostic prénatal d'une trisomie 21 sur cellules amniotiques non cultivées.

La sonde spécifique de locus du chromosome 21 fluoresce en vert. La sonde spécifique du chromosome 14 fluoresce en rouge. Noter la présence de trois signaux verts qui attestent l'existence d'une trisomie 21.

B. Diagnostic préimplantaire sur blastomère.

La sonde du chromosome 21 fluoresce en rouge et celle du chromosome 14, en vert.

- Embryon a : blastomère de gauche. Embryon équilibré pour les chromosomes 14 et 21.
- Embryon b : le blastomère de droite. Présence d'un seul signal vert signifiant une monosomie 14.

Seul l'embryon (a) peut être transféré.

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.

des enfants présentant une DI et/ou des MC. Après fécondation *in vitro*, il est possible de prélever des blastomères d'une morula non compactée et de détecter par FISH les embryons porteurs d'un déséquilibre génomique. Pour cela, on utilise trois sondes télomériques, dont deux spécifiques des télomères des segments chromosomiques transloqués. Comme le montre la [e-figure 7.9B](#), l'étude du nombre de signaux après hybridation de ces sondes sur les deux blastocystes prélevés permet de repérer les embryons sans déséquilibre chromosomique.

La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes

L'une des difficultés de l'étude chromosomique dans les hémopathies malignes est l'existence de mosaïcismes et de chromosomes très remaniés, peu reconnaissables. De plus, il peut être difficile dans certains types de cancers, d'obtenir un nombre de mitoses suffisant issues des cellules cancéreuses pour établir avec certitude un diagnostic. L'utilisation de la FISH en interphase est le moyen le plus facile dans ces situations pour détecter les anomalies chromosomiques spécifiques dont dépendent le diagnostic et le pronostic de l'hémopathie étudiée. Les remaniements du gène MLL dans les leucémies aiguës (voir [chapitre 8, «Cytogénétique des anomalies acquises en hématologie et des tumeurs solides»](#)) peuvent facilement être recherchés sur noyaux en interphase comme le montre la [e-figure 7.8B](#). Il existe des pathologies dans lesquelles certaines équipes ne pratiquent que la FISH interphasique comme examen des chromosomes. C'est le cas des leucémies lymphoïdes chroniques pour lesquelles elles ne recherchent par FISH interphasique que les délétions des gènes *P53*, *ATM* et du locus 13q14 ainsi que la trisomie 12, anomalies dont dépend le pronostic.

Le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires

Il est possible d'hybrider des sondes sur des coupes fines de tissus fixés par de la paraffine et sur des cellules obtenues par apposition de coupes de tissus congelés. Ces techniques de FISH sont d'une très grande utilité en fœtopathologie ou en pathologie cancéreuse, lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir du tissu vivant ou des cultures du tissu concerné.

En résumé, la FISH sur métaphase est devenue le complément indispensable du caryotype. Sur noyau interphasique, elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. Cependant, elle reste un examen ciblé du génome qui nécessite de connaître l'anomalie à rechercher.

L'ACPA

L'ACPA, technique de recherche clinique en pathologie acquise

Les anomalies chromosomiques impliquées dans le diagnostic et le pronostic des cancers sont souvent équilibrées. Dans les hémopathies malignes, près de 400 anomalies chromosomiques récurrentes et équilibrées ont été rapportées. Pour ces raisons (anomalies équilibrées, mosaïcisme et anomalies ciblées), l'ACPA n'est pas, en 2015, un examen de première intention pour la détection des remaniements chromosomiques dans ces pathologies. Néanmoins, en recherche, elle a permis l'identification de nouveaux oncogènes grâce à la détection de déséquilibres chromosomiques récurrents. L'une des découvertes majeure fut la mise en évidence de délétions du gène *IKAROS* à l'origine de certaines acutisations des leucémies myéloïdes chroniques [13].

L'ACPA: technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles

À l'inverse des pathologies acquises, l'ACPA est aujourd'hui l'examen de choix pour l'étude en routine des pathologies associées aux anomalies chromosomiques constitutionnelles. En effet, outre de très rares anomalies de structures équilibrées *de novo*, ce sont les déséquilibres génomiques qui sont les principales causes chromosomiques de troubles neurodéveloppementaux.

L'ACPA permet non seulement de détecter les anomalies chromosomiques déséquilibrées détectées par le caryotype (taille supérieure à 5 et 10 Mb) mais aussi celles qui sont cryptiques. Aujourd'hui, c'est une technique fiable, reproductible et automatisable.

Elle est désormais devenue l'examen de première intention dans les laboratoires de cytogénétique pour la détection des remaniements chromosomiques associés à la déficience intellectuelle, aux malformations congénitales et aux troubles autistiques.

Comment interpréter une ACPA ?

La signification d'un CNV identifié dans la pathogenèse du phénotype observé peut parfois être très difficile à établir. Certains CNV sont clairement pathogènes mais parfois avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable alors que d'autres posent des problèmes d'interprétation. D'autres encore sont considérés comme bénins.

Classification des CNV

Les CNV bénins

Jusqu'à récemment, il était communément admis que l'ADN entre deux individus était identique à 99,9 %. Seules les variations « qualitatives » de l'ADN liées à des modifications de bases nucléotidiques étaient alors connues. L'étude génomique de témoins par CGH-array a mis en évidence l'existence de CNV considérés comme bénins [14]. L'étude de ces CNV a montré qu'il s'agissait le plus souvent de répétitions en tandem de cassettes d'ADN de taille variable (la plupart d'entre elles ont une taille inférieure à 100 kb) pouvant comprendre des séquences codantes et non codantes. Le nombre de répétition de ces cassettes (de 0 à plus de 20) varie d'un individu à l'autre et définit les allèles du CNV qui se transmettent de manière mendélienne. Lorsque ces CNV sont retrouvées chez plus de 1 % de la population, on parle *copy number polymorphisms* (CNP) [15, 16]. La majorité de ces CNP sont sans conséquence phénotypique actuellement décelée alors que d'autres sont associés à des maladies multifactorielles fréquentes (comme le lupus) ou sont le témoin de l'adaptation humaine à l'environnement [17, 18].

Les CNV pathogènes

D'autres CNV sont clairement associés à un phénotype anormal. Ce sont souvent des CNV d'une taille supérieure à 400 kb. Dans les grandes séries de patients avec DI et/ou MC testés par CGH-array, des CNV pathogènes cryptiques sont retrouvés dans environ 12 % des cas [19]. Classiquement, ils surviennent *de novo*, correspondent à des délétions (70 % des cas) et sont plutôt de grande taille (en moyenne de 2,8 Mb). On admet qu'à partir de 1,5 Mb, un CNV est pratiquement toujours associé à la pathologie observée [10].

Les CNV pathogènes avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable

Certains CNV identifiés chez des patients avec un phénotype anormal sont nécessaires à la survenue de la pathologie mais ils ne sont pas suffisants en raison de leur présence chez un des deux parents sains ou des individus normaux. Ces CNV rares confèrent un risque plus ou moins important de développer la pathologie. Par exemple, des délétions comprenant le locus du gène *CHRNA7*, localisé en 15q13, peuvent être associées à des épilepsies isolées, à des troubles psychiatriques (autisme, schizophrénie, troubles bipolaires), ou à une déficience intellectuelle [20]. Un autre exemple est la délétion 16p11.2 qui est associée à une obésité, une macrocéphalie, des troubles autistiques et une épilepsie, alors que la duplication de

cette même région est associée à phénotype en « miroir » (microcéphalie, retard de croissance, anorexie et déficit intellectuel) [21, 22].

Dans ces syndromes, la présence d'autres facteurs génétiques, épigénétiques ou environnementaux pourrait expliquer la pénétrance incomplète et l'expressivité variable de la maladie. Une meilleure compréhension des interactions entre ces différents facteurs permettrait d'établir des corrélations génotype-phénotype et ainsi de proposer un conseil génétique plus précis.

Les CNV dont la signification clinique est incertaine (*variant of uncertain significance, VOUS*)

Enfin, certains CNV soulèvent des difficultés d'interprétation. Ils correspondent le plus souvent à des duplications (70 % des cas) d'une taille d'environ 700 kb qui sont héritées de l'un des deux parents sains ou retrouvés dans des populations témoins [10].

Plusieurs éléments sont à considérer pour déterminer si le CNV identifié est délétère ou non. Miller *et al.* [19] ont ainsi proposé une table avec différents critères d'évaluation des CNV pour aider à l'interprétation des résultats. Les arguments majeurs pour affirmer qu'un CNV est pathogène sont : son caractère *de novo*, sa taille supérieure à 400 kb, son contenu riche en gènes et l'existence d'autres patients avec le même CNV dont le phénotype est anormal (il peut s'agir de syndromes connus ou non). À l'inverse, un CNV hérité d'un parent sain, décrit chez des individus normaux dans les bases de données, pauvre en gènes et de petite taille est très souvent bénin. Des études de cas témoins à grande échelle ont permis une avancée majeure dans l'interprétation des CNV [10, 23].

En routine, pour éviter de détecter des CNV bénins et de signification incertaine, il est préconisé de fixer le seuil de détection d'une anomalie à 400 kb pour le diagnostic des microremaniements chez les patients avec DI et/ou MC [19].

Du fait de la difficulté d'interprétation de certains CNV ou de la possible détection d'un CNV ayant un impact médical sans lien avec l'indication initiale, il est important qu'une information claire soit fournie aux parents. Le recueil d'un consentement spécifique en vue de la réalisation de cette analyse est nécessaire.

Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents

Il est indispensable de vérifier par une autre technique un CNV mis en évidence par ACPA, d'une part pour exclure un faux positif (ce qui est aujourd'hui rare avec les puces à oligonucléotides) mais surtout pour déterminer le

mécanisme chromosomique du remaniement. Par exemple, un gain de matériel chromosomique peut être le résultat de la présence d'une duplication *in situ*, d'un dérivé d'une insertion ou d'un marqueur chromosomique (e-figure 7.10). Il est possible d'utiliser des techniques de biologie moléculaire (qPCR, QMPSF, etc., en particulier lorsqu'il s'agit d'une duplication de petite taille) mais la technique de référence reste la FISH sur chromosome car, réalisée sur le proposant et ses parents, elle renseigne sur le mécanisme chromosomique à l'origine du CNV et son caractère *de novo* ou non.

Utilisation des bases de données de variants de structure du génome

Pour aider à l'interprétation des résultats, il existe différentes bases de données. La *Database of Genomic Variant* (<http://projects.tcag.ca/variation>), répertorie les CNV bénins identifiés chez des témoins. Les bases de données DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) et ECARUCA (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca>) colligent les CNV retrouvées chez des patients avec DI et/ou MC. Les informations fournies sont précieuses car elles aident le cytogénéticien dans l'établissement du rapport phénotype-génotype.

ACPA et recherche clinique en pathologie constitutionnelle

Du fait de la connaissance du contenu en gènes du segment remanié, le cytogénéticien peut rechercher le(s) gène(s) potentiellement impliqué(s) dans le phénotype. Par ailleurs, la comparaison d'anomalies chevauchantes chez plusieurs patients permet d'identifier des régions et/ou des gènes contribuant à un signe clinique spécifique, voire à l'ensemble des symptômes du syndrome. Par exemple, l'étude par CGH-array de patients porteurs de délétions chevauchantes de la région 5q14.3q15 a permis l'identification du gène majeur (MEF2C) responsable du phénotype. En effet, des mutations dans ce gène ont été mises en évidence chez des patients avec une déficience intellectuelle sévère [24].

La recherche systématique d'anomalies chromosomiques cryptiques chez les patients présentant une DI et/ou MC a été à l'origine, par l'analyse rétrospective des patients, de la description de nouveaux syndromes associés à des microdélétions ou microduplications. Classiquement, les syndromes ont été initialement décrits cliniquement et les bases génétiques n'ont été découvertes que secondairement. La CGH-array permet un processus inverse où

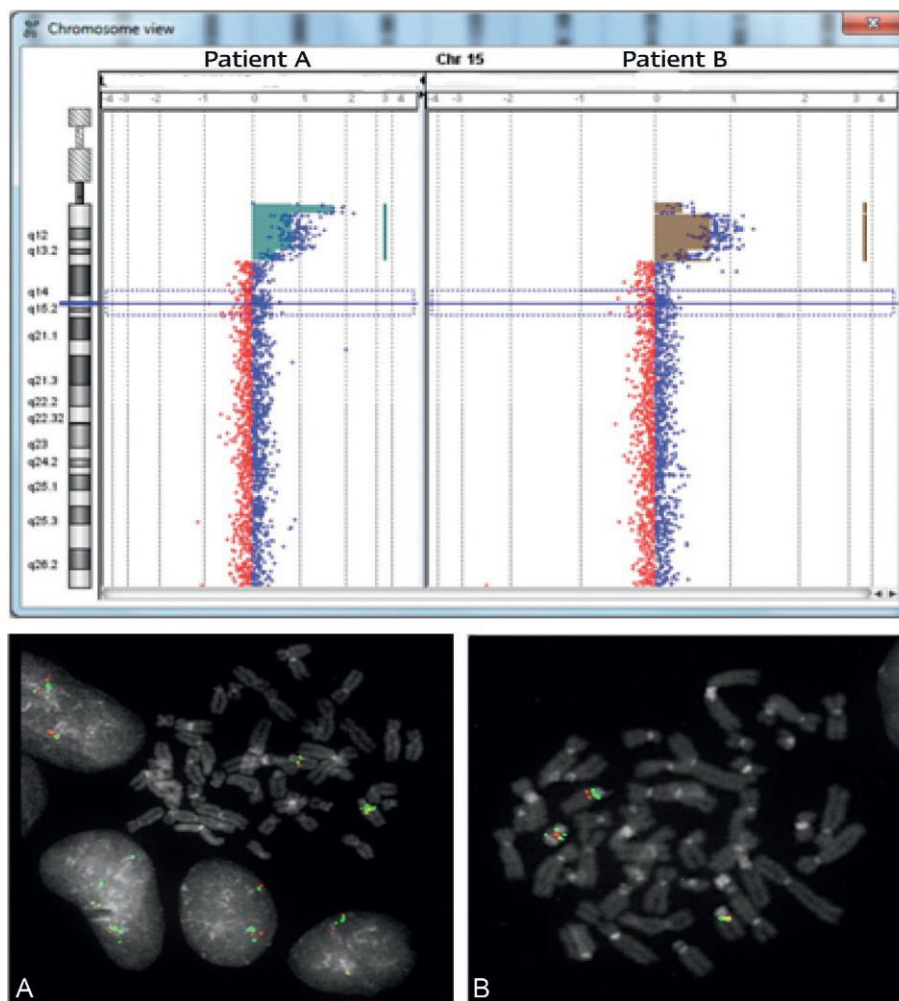
l'identification de l'anomalie chromosomique précède la description phénotypique. Ainsi, la CGH-array permet d'aller du génotype au phénotype. De nombreux syndromes ont pu être décrits cliniquement comme la délétion 17q21.31 [25].

Limites de l'ACPA

Contrairement au caryotype, l'ACPA ne détecte pas les anomalies chromosomiques équilibrées. Une étude récente a montré qu'une translocation ou inversion *de novo* équilibrée ne serait pas détectée dans environ 0,23 % des cas [26]. Les anomalies équilibrées sont le plus souvent retrouvées chez des individus sains. Leur découverte se fait dans le cadre d'un bilan de fausses couches à répétition (liées à la transmission du remaniement sous forme déséquilibrée à la descendance), d'hypofertilité ou de manière fortuite. Le caryotype conserve donc sa place dans ces indications. Dans les rares cas où un remaniement équilibré *de novo* est retrouvé chez un patient avec une DI et/ou des MC, il est très difficile d'affirmer qu'il est à l'origine des signes cliniques observés. Enfin, la CGH-array ne détecte pas les remaniements déséquilibrés présents en mosaïque dans moins de 10–20 % des cellules, ce qui peut être le cas pour les marqueurs chromosomiques.

Conclusion : la nouvelle cytogénétique

L'émergence de l'ACPA a bouleversé la cytogénétique médicale. Pendant plus de 40 ans, le diagnostic cytogénétique a reposé sur l'analyse morphologique des chromosomes ou des signaux fluorescents d'hybridation *in situ* sur des métaphases ou des noyaux interphasiques. Aujourd'hui, l'analyse du génome par ACPA s'effectue à partir de l'ADN de milliers de cellules d'un individu. Technique complémentaire du caryotype en bandes durant 25 ans, la cytogénétique moléculaire s'affirme aujourd'hui comme l'élément central de l'activité des laboratoires de cytogénétique. Il s'agit d'une véritable rupture culturelle, scientifique et pratique qui s'amplifiera avec l'arrivée, dans les toutes prochaines années, des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS, pour *next-generation sequencing*). Cela entraîne des changements radicaux dans l'organisation des laboratoires de cytogénétique ainsi que dans leur rapport avec les laboratoires de génétique moléculaire. De plus, cette nouvelle approche implique l'acquisition d'autres compétences techniques et médicales.



e-figure 7.10

La vérification par FISH d'une anomalie détectée par CGH-array est indispensable pour établir le diagnostic.

Gain de la région 15q11.2q13.3 chez deux patients. Notez que le profil du CNV est différent chez les deux patients mais que la zone en « double gain » (ratio à 1) est identique.

L'hybridation *in situ* fluorescente avec une sonde de la région en « double gain » montre l'existence d'une triplication chez le patient A et d'un marqueur chez le patient B.

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.

Aujourd'hui, l'activité principale du cytogénéticien, n'est plus l'étude de la morphologie des chromosomes. Il consacre l'essentiel de son temps à l'établissement d'un rapport phénotype-génotype au niveau moléculaire, c'est-à-dire à déterminer si le CNV détecté est à l'origine du phénotype observé. La généralisation de la technique de l'ACPA au sein des laboratoires a augmenté considérablement les données sur les CNV identifiés. Au fil des années, une cartographie précise des phénotypes liés aux anomalies de régions du génome sera établie. Partant de toutes ces données pour déterminer le lien entre le CNV et le phénotype, le cytogénéticien devient un «interniste du génome».

Références

- [1] Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides : novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(11) : 6633–7.
- [2] Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12; 21) : a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 9(3) : 186–91.
- [3] Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW *et al.* Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 1987; 77(4) : 366–70.
- [4] Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12(4) : 368–75.
- [5] Schröck E, du Manoir S, Veldman T, *et al.* Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273(5274) : 494–7.
- [6] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258(5083) : 818–21.
- [7] Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, *et al.* Matrix-based comparative genomic hybridization : biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20(4) : 399–407.
- [8] Pinkel D, Seagraves R, Sudar Det *al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20(2) : 207–11.
- [9] Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, *et al.* A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; 36(3) : 299–303.
- [10] Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011; 43 : 838–46.
- [11] Romana SP, Tachdjian G, Druart L, *et al.* A simple method for pre-natal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet* 1993; 1(3) : 245–51.
- [12] Penketh RJ, Delhanty JD, van den Berghe JA, *et al.* Rapid sexing of human embryos by non-radioactive in situ hybridization : potential for preimplantation diagnosis of X-linked disorders. *Prenat Diagn* 1989; 9(7) : 489–99.
- [13] Mullighan CG, Su X, Zhang J, *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360(5) : 470–80.
- [14] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444 : 444–54.
- [15] Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10 : 451–81.
- [16] Sudmant P, Kitzman J, Antonacci F, *et al.* Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 2010; 330 : 641–6.
- [17] Perry G, Dominy N, Claw K, *et al.* Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet* 2007; 39(10) : 1256–60.
- [18] Mamtani M, Anaya J-M, He W, *et al.* Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes Immun* 2010; 11 : 155–60.
- [19] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, *et al.* Consensus statement : Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86 : 749–64.
- [20] Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, *et al.* A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 2008; 40(3) : 322–8.
- [21] Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, *et al.* A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 2010; 463 : 671–5.
- [22] Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, *et al.* Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 2011; 478(7367) : 97–102.
- [23] Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, *et al.* Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet* 2014; 46(10) : 1063–71.
- [24] Mikhail FM, Lose EJ, Robin NH, *et al.* Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(10) : 2386–96.
- [25] Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, *et al.* A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 2006; 38 : 999–1001.
- [26] Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, *et al.* Array analysis and karyotyping : workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* 2009; 52:161–9.

ENTRAÎNEMENT 7 QCM-QCS

QCM 1

Vous réalisez un caryotype pour un enfant qui présente des troubles moteurs d'apparition progressive. Le résultat du caryotype est 46,XY.

Ce résultat permet :

- A. D'exclure une anomalie de nombre des chromosomes
- B. D'exclure un remaniement équilibré de grande taille
- C. D'exclure une délétion de 3 Mb
- D. D'exclure un variant génique nucléotidique
- E. D'exclure une délétion de trois paires de bases

QCM 2

La technique d'hybridation génomique comparative sur microarray ou analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) :

- A. Nécessite une culture cellulaire
- B. Nécessite un témoin
- C. Permet d'identifier une translocation équilibrée
- D. Met en évidence des variations du nombre de copies (CNV)
- E. Est moins résolutive que le caryotype

QCM 3

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

- A. Nécessite une sonde
- B. Est une technique permettant une étude globale du génome
- C. Permet de diagnostiquer une anomalie de nombre des chromosomes sur un noyau en interphase
- D. Permet de diagnostiquer une délétion de 5 kb (kilobases)
- E. Peut identifier une délétion subtélomérique invisible sur un caryotype

QCS 1

En salle de naissance, on vous confie un enfant qui présente un retard de croissance important et diverses malformations. Vous évoquez une possible triploïdie. Pour confirmer votre suspicion, vous prescrivez :

- A. Un séquençage de tout le génome
- B. Un caryotype constitutionnel sur lymphocytes
- C. Une FISH avec une sonde du chromosome 21
- D. Un Southern blot
- E. Aucune de ces techniques

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 7.1

Les sondes.

A. Sondes centromériques :

- en rouge : sonde centromérique du chromosome 8;
- en vert : sonde centromérique du chromosome 17.

B. Sondes spécifiques de loci :

- en rouge : sonde télomérique du chromosome 12;
- en vert : sonde télomérique du chromosome 8.

C. Sondes de peintures chromosomiques :

- en vert : sonde de peinture du chromosome 10;
- en rouge : sonde de peinture du chromosome 13.

La FISH pratiquée avec ces deux sondes de peintures chromosomiques détecte une translocation réciproque (10, 13).

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.



e-figure 7.2

La multifuorescence.

A. Hybridation de 24 sondes de peintures chromosomiques révélée par analyse spectrale. Caractérisation de l'origine (chromosome 5) d'un petit marqueur.

B. Hybridation de 12 sondes spécifiques des régions pseudotélomériques de 12 chromosomes. Dans ce dispositif, un autre lot de 12 sondes correspondant aux autres chromosomes est hybridé sur une autre plage de la lame. Les extrémités de tous les chromosomes sont analysées avec ce procédé (Mega-Telomeric Probes, Necker-Enfants malades).

C. Hybridation d'un des lots du système M-centromère (M-Cen : Necker-Enfants malades).

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.



e-figure 7.3

Principe de l'hybridation *in situ* fluorescente.



e-figure 7.4

Microscopie en fluorescence.



e-figure 7.5

Principe de la CGH sur chromosome.

A. Principe de CGH-array sur chromosome.

Une quantité d'ADN d'un patient est marquée avec un fluorochrome (symbolisé par la couleur verte). La même quantité d'ADN d'un témoin est marquée avec un fluorochrome différent (symbolisé par la couleur rouge-jaune). Le tout est mélangé et hybridé sur une lame sur laquelle ont été étalés des chromosomes d'un témoin.

B. Interprétation d'une CGH-array sur chromosome.

Après hybridation, l'intensité de la fluorescence des deux sondes est numérisée le long de l'axe longitudinal de chaque paire chromosomique et un rapport d'intensité des deux fluorescences est établi après traitement informatique des données. Ce rapport est objectivé sous forme d'une ligne le long d'un idéogramme chromosomique. Les valeurs sont données en logarithme de base 2. De ce fait, la valeur 0 représente l'égalité parfaite entre les intensités des deux fluorescences. On considère qu'il y a une perte d'une région si les valeurs d'intensité au niveau de cette région sont inférieures à 0,80 et un gain si les valeurs sont supérieures à 1,25.



e-figure 7.6

Principe de la CGH-array.

A. La sonde est préparée à partir d'une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin (comme pour la CGH sur chromosome). Le mélange est hybridé sur des lames sur lesquelles sont fixées des sondes BAC, PAC ou des oligonucléotides. B. Hybridation sur une lame sur laquelle ont été fixés 244 000 oligonucléotides de 60 mers, soit environ 1 nucléotide choisi tous les 10 000 paires de base du génome. C. Grossissement d'un secteur de la lame d'une magnitude de 100. Chaque spot fluorescent est le résultat de l'hybridation de la sonde au niveau de milliers d'oligonucléotides ayant la même séquence et fixés au niveau du spot. D. Une valeur moyenne du rapport de fluorescence est établie pour chaque spot d'oligonucléotides. L'ensemble des valeurs est rapporté en regard d'un idéogramme chromosomique. Chaque point représente la valeur du rapport entre les deux fluorescences au niveau des spots. Un point bleu signifie que la valeur du rapport de fluorescence est supérieure à 0; un point rouge que ce rapport est inférieur à 0 (log base 2). Les valeurs normales sont comprises entre -1 et 0,5. Ici, on considère qu'il n'y a pas de déséquilibre au niveau du chromosome 2 (les points qui sont en dehors de ces valeurs sont des artéfacts).

Images : hôpital Necker-Enfants malades.



e-figure 7.7

Principe de la SNP-array.

A-1. SNP-array normale, représentation des haplotypes. La ligne supérieure représente les haplotypes BB, la ligne du bas, les haplotypes AA et celle du milieu, les haplotypes AB des différents SNP d'un chromosome du patient.

A-2. SNP-array normale, représentation du nombre de copies. Toutes les valeurs sont comprises entre -1 et 0,5.

B-1. Délétion détectée par SNP-array. La délétion entraîne une perte d'hétérozygotie. Le patient a, dans la région délétée, l'haplotype A ou B. B-2. Délétion détectée par SNP-array. La ligne rouge représentant la moyenne du rapport de fluorescence montre un rapport de fluorescence d'une valeur de -1 au niveau de la zone délétée.

C-1. Isodisomie du chromosome 16 détectée par SNP-array. Le patient n'a pas d'haplotype AB sur tout le chromosome 16. Il y a une perte d'hétérozygotie sur tout le chromosome 16.

C-2. Isodisomie du chromosome 16 détectée par SNP-array. Il n'y a pas de perte de nombre de copies sur tout le chromosome 16.

Images : Dr Boris Keren, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris.



e-figure 7.8

FISH sur métaphases.

A. Détection par FISH d'une délétion 22q11.21 associée au syndrome DG/VCF. Le signal vert est généré par une sonde télomérique du chromosome 22 (sonde contrôle). Le signal rouge est généré par une sonde de la région testée en 22q11.21. Chez ce patient, il n'y a qu'un seul signal rouge.

B. Détection d'un remaniement du gène MLL. Sur le chromosome 11 non remanié, les deux sondes couvrant le locus du gène MLL génèrent un signal coalescent. Chez ce patient, il existe une translocation impliquant le chromosome 11 avec un point de cassure localisé dans le gène MLL entre les deux sondes. De ce fait, les signaux sont séparés : le signal rouge reste sur le der (11) et le signal vert se localise sur l'autre chromosome dérivé.

Notez que le noyau interphasique, un couple de signaux est coalescent (chromosome 11 non remanié) et l'autre est séparé, indiquant ainsi le remaniement de MLL.

C. Caractérisation par analyse spectrale de remaniements chromosomiques complexes dans une leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant.

- À gauche, une métaphase de lymphoblastes, la flèche indique un marqueur chromosomique.

- À droite, le caryotype « multicolore » établi par analyse spectrale. Notez dans la case du chromosome 7 que le marqueur est composé de chromosome 7, puis de chromosome 12 suivi de chromosome 7 avec dans la région terminale du bras long, du chromosome 22. Notez aussi l'existence d'autres anomalies : une translocation t(2; 12) et une translocation t(12; 21) non détectable par des techniques de bandes.



e-figure 7.9

La FISH interphasique.

A. *Diagnostic prénatal d'une trisomie 21 sur cellules amniotiques non cultivées.*

La sonde spécifique de locus du chromosome 21 fluoresce en vert. La sonde spécifique du chromosome 14 fluoresce en rouge. Noter la présence de trois signaux verts qui attestent l'existence d'une trisomie 21.

B. *Diagnostic préimplantaire sur blastomère.*

La sonde du chromosome 21 fluoresce en rouge et celle du chromosome 14, en vert.

- Embryon a : blastomère de gauche. Embryon équilibré pour les chromosomes 14 et 21.
 - Embryon b : le blastomère de droite. Présence d'un seul signal vert signifiant une monosomie 14.
- Seul l'embryon (a) peut être transféré.

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.



e-figure 7.10

La vérification par FISH d'une anomalie détectée par CGH-array est indispensable pour établir le diagnostic.

Gain de la région 15q11.2q13.3 chez deux patients. Notez que le profil du CNV est différent chez les deux patients mais que la zone en « double gain » (ratio à 1) est identique.

L'hybridation *in situ* fluorescente avec une sonde de la région en « double gain » montre l'existence d'une triplification chez le patient A et d'un marqueur chez le patient B.

Sondes et images : hôpital Necker-Enfants malades.



Anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides

Chrystèle Bilhou-Nabéra, Nathalie Auger

PLAN DU CHAPITRE

Cytogénétique des hémopathies malignes	90
Techniques d'étude	91
Intérêt clinique de l'analyse génétique dans la prise en charge d'un patient atteint d'hémopathie maligne	91
Perspectives	93
Points clés, hémopathies malignes	94
Cytogénétique des tumeurs solides	94
Techniques d'étude	95
Cytogénétique diagnostique	96
Pronostic	97
Médecine personnalisée	98
Points clés, tumeurs solides	98
Conclusion générale	99

Dans les hémopathies malignes de nombreuses anomalies chromosomiques peuvent être identifiées. Ces anomalies ont la particularité d'être acquises et d'évoluer de façon clonale. Elles peuvent être de nombre ou, surtout, de structure. Certaines translocations réciproques récurrentes sont responsables de la création d'un gène de fusion. L'exemple le plus connu est le modèle moléculaire de la protéine de fusion correspondant à la transcription puis la traduction du gène de fusion entre les gènes *BCR* et *ABL* secondaire à la translocation réciproque t(9; 22)(q34; q11) spécifique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) qui

a été la première anomalie cytogénétique décrite dans une hémopathie maligne. De même, dans les tumeurs solides, différents types d'anomalies chromosomiques ont été identifiés. Actuellement, en plus des données cyto- logiques et histologiques, l'identification d'une anomalie génétique fait partie intégrante de la démarche diagnos- tique des hémopathies malignes et des tumeurs solides. L'identification d'anomalies chromosomiques intervient également dans la stratification pronostique, les choix thé- rapeutiques et permet l'évaluation de la maladie résiduelle après traitement.

Cytogénétique des hémopathies malignes

Les anomalies chromosomiques décelées dans les hémop- athies malignes sont acquises (restreintes au clone malin), clonales, primaires ou secondaires. Qu'elles soient de nombre et/ou de structure, ces anomalies ne surviennent pas au hasard, certaines étant spécifiques d'une entité pathologique. L'analyse génétique est primordiale lors du diagnostic car elle contribuera à la caractérisation de l'entité pathologique.

On décrit des anomalies cytogénétiques primaires, géné- ralement isolées et spécifiques d'une entité, et des anoma- lies secondaires, associées aux anomalies primaires, moins spécifiques et reflet d'une évolution du clone malin voire d'une instabilité génétique.

Selon l'ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), une anomalie est considérée comme clonale lorsque deux métaphases comportent le même gain chromosomique ou la même anomalie de structure, ou lorsque trois métaphases présentent la même perte chromosomique. Au minimum, vingt métaphases « sans anomalie clonale décelable » doivent être analysées pour affirmer une absence d'anomalie cytogénétique.

Les anomalies décrites sont des anomalies de structure comme des translocations, inversions para- ou péricen- triques, délétions mais aussi des anomalies de nombre comme des monosomies ou trisomies voire des anomalies de la ploïdie. Les amplifications géniques sont rarement observées dans les hémopathies malignes. Sur le plan gé- nétique, lors d'un remaniement de structure, deux principaux modèles moléculaires ont été décrits :

- le modèle « gène de fusion » est caractérisé par la mise en continuité des séquences 5' du gène amont et des séquences 3' du gène aval avec conservation du cadre

ouvert de lecture. Cette fusion a comme conséquence la production d'une protéine de fusion.

- le modèle avec une « hyperexpression » est caractérisé par la mise en contiguïté d'un gène cible avec les séquences régulatrices (souvent un *enhancer*) d'un second gène (gène d'une immunoglobuline ou d'un récepteur T le plus sou- vent) qui en contrôle l'expression. La conséquence est une surexpression ou une expression ectopique du gène cible.

Les gènes impliqués dans les translocations sont regrou- pés en plusieurs classes : 1. tyrosine et sérine kinases, 2. récepteurs de la surface cellulaire, 3. facteurs de croissance 4. facteurs intervenant dans la régulation de la transcription 5. ou de l'apoptose.

Considéré comme le modèle moléculaire de la pro- téine de fusion, le chromosome Philadelphie (Ph) [correspondant au der(22)t(9;22) de la translocation réciproque t(9;22)(q34;q11)] spécifique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) a été la première anomalie cytogénétique décrite dans une hémopathie maligne. En 1973, J. Rowley identifie le Ph comme la résultante d'une translocation réciproque t(9;22)(q34;q11), présente dans 90 % des cas. Sa mise en évidence affirme le diagnostic de LMC. En 1984, le remaniement moléculaire est carac- térisé avec le clonage des sites de cassure : le proto-oncogène *ABL1* (ou Abelson) (9q34) et le gène *BCR* (pour *break- point cluster region*)(22q11). La fusion de la région 3'*ABL1* (cassure au niveau des introns IA ou II) et de la région 5' du gène *BCR* conduit à la formation d'un gène de fusion et à la production d'un ARN messager de 8,5 kb traduit en une protéine hybride fonctionnelle en raison de la conservation du cadre ouvert de lecture. La consé- quence est une dérégulation de l'activité tyrosine-kinase

de la protéine ABL, exprimée de façon constitutive. Des translocations variantes (implication d'un chromosome supplémentaire différent des chromosomes 9 et 22) ou une translocation cryptique (remaniement uniquement moléculaire) sont également décrites. La mise en évidence du produit de fusion *BCR-ABL1* par biologie moléculaire (RT-PCR ou FISH) confirme le diagnostic. Une thérapie ciblée (activité antityrosine kinase) avec des inhibiteurs de tyrosine kinase est actuellement le traitement proposé.

Le second modèle, décrit en 1981, concerne le lymphome de Burkitt où la translocation $t(8;14)(q24;q32)$ met en contiguïté le gène *c-MYC* avec un *enhancer* (ou séquence amplificatrice) localisé entre les parties variables et constantes du gène des immunoglobulines, chaînes lourdes (*IGH*) ou chaînes légères. La conséquence est une hyperexpression de cet oncogène *c-MYC*. Dans ce type de modèle, l'expression de l'oncogène est modifiée par effet de position.

Quel que soit le type de remaniement, la conséquence est un avantage prolifératif du clone anormal.

Techniques d'étude

Le caryotype est le principal examen utilisé pour identifier sans *a priori* une anomalie chromosomique de nombre ou de structure. Le caryotype est réalisé sur un prélèvement sanguin, médullaire, ganglionnaire ou tumoral infiltré par des cellules tumorales. Il reste, en oncohématologie, une technique de référence qui « visualise » le génome entier.

Les conditions de culture dépendent de la pathologie et ne seront pas détaillées. Il s'agit de cultures courtes (24 h–72 h) avec adjonction ou non de *c* ou de facteurs de croissance. Il est important de connaître le pourcentage de cellules pathologiques infiltrant l'échantillon mis en culture et de disposer des données cliniques, morphologiques et immunophénotypiques pour une interprétation adéquate des résultats cytogénétiques.

Cette analyse globale du génome a ses limites en raison du risque d'échec de culture et d'une faible résolution qui ne permet pas de mettre en évidence des anomalies de structure de petite taille (seuil de résolution ~ 10 Mb) ou cryptiques. Il faut donc avoir recours à la cytogénétique moléculaire (*fluorescence in situ hybridization* [FISH]) ou à des techniques de biologie moléculaire pour identifier des remaniements géniques dont

on connaît par des études rétrospectives antérieures la valeur pronostique. Sont utilisées en FISH des sondes de peinture chromosomique, centromériques (pour les anomalies de nombre) ou locus-spécifiques (sondes de fusion ou de séparation dans le cadre de remaniement de structure).

L'hybridation génomique comparative et l'analyse des polymorphismes prennent progressivement leur place dans la démarche diagnostique des hémopathies mais ne seront pas développées dans ce chapitre.

Intérêt clinique de l'analyse génétique dans la prise en charge d'un patient atteint d'hémopathie maligne

L'identification d'une anomalie génétique fait partie intégrante de la démarche diagnostique, intervient dans la stratification pronostique, les choix thérapeutiques et permet l'évaluation de la maladie résiduelle après traitement.

Lors du diagnostic, l'analyse génétique effectuée comporte au minimum un caryotype, éventuellement une FISH pour préciser un remaniement chromosomique, une analyse en biologie moléculaire pour rechercher des anomalies connues comme ayant une valeur diagnostique et pronostique et non décelées en cytogénétique, une conservation de matériel cellulaire (tumorothèque, DNA/RNA-thèque...) pour d'éventuelles analyses rétrospectives dans le cadre de protocoles de recherche. Un certificat de non-opposition de conservation de matériel doit être conservé.

Diagnostic : les anomalies cytogénétiques identifiées sont prises en compte pour la classification des hémopathies malignes

Les anomalies cytogénétiques observées dans les hémopathies malignes sont trop nombreuses pour être toutes énoncées; un ou deux exemples ont été choisis pour illustrer chacun des trois *items* qui suivent :

- les bases de données comme l'*Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology* [1] ou *Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer* [2] décrivent les principales anomalies connues

dans les hémopathies malignes. La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), de 2008 [3] fait la synthèse des données cliniques, cytologiques, immunophénotypiques et génétiques pour chaque entité décrite et constitue un document de référence dans la démarche diagnostique des hémopathies malignes.

- À titre d'exemple, la classification des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) individualise huit items :

1. LAM avec anomalies génétiques récurrentes;
2. secondaires à une myélodysplasie;
3. secondaires à un traitement;
4. LAM sans les caractéristiques citées précédemment;
5. sarcome myéloïde;
6. LAM associées à la trisomie 21;
7. LAM dendritiques;
8. LAM avec différenciation ambiguë.

- Dans l'entité «LAM associées à des anomalies génétiques récurrentes» sont regroupées les entités suivantes : t(8;21)(q22;q22): *RUNX1-RUNXT1*; inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13;q22): *CBFb-MYH11*; t(15;17)(q24;q21): *PML-RARA*; t(9;11)(p22;q23): *MLLT3-MLL*; t(6;9)(p23;q34): *DEK-NUP214*; inv(3)(q21q26) ou t(3;3)(q21;q26): *RPN1-EV11*; t(1;22)(p13;q13): *RBM15-MKL1*;

- dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), on individualise les entités associées à des anomalies de structure comme une t(9;22)(q34;q11)(*BCR-ABL1*), une t(12;21)(p13;q21)(*ETV6-RUNX1*), une t(1;19)(q23;p13)(*TCF3-PBX1*), un remaniement du gène homéotique *MLL*(ou *KMT2A*)(11q23) avec la t(4;11)(q21;q23)(*MLL-A2F1*) ou des anomalies de nombre comme une hyper- ou une hypodiploïdie;

- Si aucun marqueur cytogénétique n'est identifié (caryotype sans anomalie clonale décelée), la démarche diagnostique intégrera les données obtenues avec la biologie moléculaire. Seront recherchés transcrits de fusion (anomalie cytogénétique cryptique), hyperexpression génique, mutations, délétions, duplications ou insertions des gènes cibles impliqués dans la pathologie concernée.

- Les nouvelles technologies (SNP, hybridation génomique comparative, séquençage à haut débit) ont permis l'identification de mutations, d'insertions-délétions (*indel*), de transcrits de fusion non décrits avec les techniques antérieurement utilisées. Une hiérarchisation des anomalies génétiques dans l'émergence du clone anormal a également été établie. On distingue ainsi des mutations *drivers* (guides ou fondatrices) actives dans l'évolution vers l'hémopathie maligne et des mutations *passengers* (passagères), reflet de l'existence de sous-clones. Il est désormais acquis que l'émergence d'une hémopathie maligne est la conséquence

de l'acquisition progressive de mutations *drivers* au niveau des cellules-souches hématopoïétiques [4].

- Dans les LAM, un récent article [5] identifie une moyenne de cinq gènes récurrents mutés par échantillon analysé. Ces mutations impliquent l'une des neuf catégories de gènes reconnus dans leur implication dans la leucémogénèse : gènes codant pour un facteur de transcription(transcrit de fusion)(18 %), gène codant pour la nucléophosmine (*NPM1*) (27 %), un gène suppresseur de tumeur (16 %), un gène impliqué dans la méthylation de l'ADN (44 %), dans une voie de signalisation (59 %) ou dans la configuration chromatinienne (22 %), codant pour un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse myéloïde (22 %) ou impliqué dans le complexe cohésine (13 %) ou d'épissage (14 %). Ces mutations peuvent être associées (on parle alors d'entité moléculaire avec, comme exemple, les LAM avec *FLT3A*, *DNMT3A*, *NPM1* mutés) ou mutuellement exclusives (comme le sont les mutations *NPM1*, *RUNX1*, *TP53*, *CEBPA*).

Suivi : la cytogénétique permet d'apprécier l'évolution de la maladie et l'efficacité d'un traitement (notion de maladie résiduelle)

Une anomalie cytogénétique ou moléculaire identifiée devient un marqueur utile pour l'évaluation quantitative de la masse cellulaire tumorale résiduelle au cours et après traitement. Cette masse tumorale résiduelle est appelée communément « maladie résiduelle ».

En fonction de leur sensibilité de détection, cytogénétique conventionnelle ou moléculaire puis biologie moléculaire sont successivement utilisées pour évaluer la masse tumorale résiduelle.

Dans la LMC, les patients sont traités avec un inhibiteur de tyrosine kinase. Si l'évolution est défavorable, des anomalies cytogénétiques additionnelles peuvent apparaître témoignant d'une évolution clonale (duplication du Ph, trisomie 8, isochromosome 17, perte de l'Y). Ces anomalies dites secondaires ont probablement leur rôle dans la leucémogénèse et sont le témoin d'une instabilité génétique. Inversement, si l'évolution est favorable sous antityrosine kinase, la reprise d'une hématopoïèse Ph-négative constitue un facteur de réponse au traitement, selon des critères énoncés par les groupes protocolaires comme l'European Leukemia Net [6] énoncés sur la figure 8.1 [7] et le tableau 8.1 [6].

Cytogénétique et classification pronostique

Pour chaque pathologie, sont individualisés des sous-groupes pronostiques. Ces classifications sont la conclusion de travaux clinicobiologiques collaboratifs effectués au sein de sociétés savantes ou de groupes de travail dans le cadre de

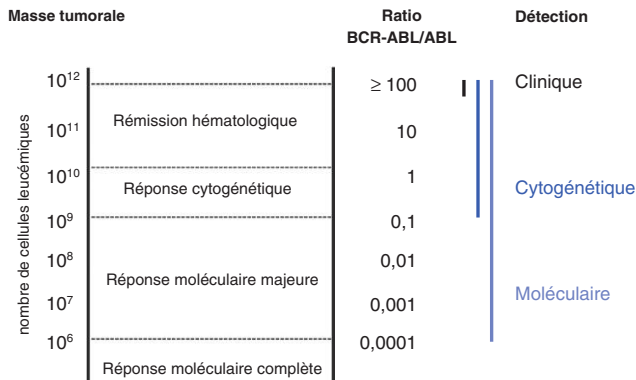


Figure 8.1

LMC : évaluation de la masse tumorale et seuils de détection des différentes techniques utilisées [7].

Tableau 8.1. Leucémie myéloïde chronique : évaluation de la réponse cytogénétique et moléculaire au cours du traitement par une antityrosine kinase.

Réponse	Optimale	Vigilance	Échec
Diagnostic		Risque élevé et ACA	
3 mois	Ph ≤ 35 % (RCP) BCR-ABL ≤ 10 %	Ph : 36 %–95 % BCR-ABL > 10 %	Aucune RHC Ph > 95 %
6 mois	Ph = 0 % (RCC) BCR-ABL < 1 %	Ph : 36 %–95 % BCR-ABL : 1–10 %	Ph > 35 % BCR-ABL > 10 %
12 mois	BCR-ABL ≤ 0,1 % (RMM)	BCR-ABL : 1–10 %	Ph > 1 % BCR-ABL > 1 %
À tout moment	RMM	ACA dans le clone Ph- (-7/7q-)	Perte RHC Perte RCC Perte RMM Mutations ACA/Ph-

RHC : rémission hématologique complète; RCC : rémission cytogénétique complète; RCP : rémission cytogénétique partielle; RMM : réponse moléculaire majeure; ACA : anomalies cytogénétiques additionnelles; Ph- : chromosome Philadelphie-négatif [6].

protocoles thérapeutiques. Ils sont régulièrement remis à jour en fonction des données publiées.

Concernant les LAM, trois groupes cytogénétiques principaux sont individualisés :

- 1. pronostic favorable : t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), t(15;17)(q24;q21);
- 2. pronostic intermédiaire : absence d'anomalie clonale décelée, trisomie 8, t(3;5), t(9;11);
- 3. pronostic péjoratif : caryotype complexe (≥ trois anomalies non apparentées), -5,5q-, 7/7q-, anomalies 11q23 (implication MLL autre que t(9; 11), inv(3)(q21q26), t(6; 9), anomalies du 17p...).

Les anomalies moléculaires sont prises en compte en association avec les anomalies cytogénétiques : duplication interne du gène *FLT3* (*FLT3-ITD*) (pronostic péjoratif), duplication partielle du gène *MLL* (*MLL-PTD*) (pronostic défavorable chez les patients de moins de 60 ans), mutations des gènes *NPM1* et *CEBPA* (biallélique) (pronostic favorable), *c-KIT* (pronostic intermédiaire), hyperexpression de *EV11* en l'absence de remaniement 3q26. Dans un avenir proche, il faudra rajouter à cette liste non exhaustive certains gènes identifiés comme fréquemment mutés par le séquençage à haut débit.

Concernant les myélodysplasies, les trois groupes cytogénétiques initialement décrits – 1. favorable (sans anomalie, del(5q) isolée, del(20q) isolée, perte Y isolée), 2. défavorable (caryotype complexe, anomalies du chromosome 7), 3. intermédiaire (les autres anomalies) – ont été élargis à cinq groupes afin de mieux stratifier le pronostic : 1. très bon (-Y, del(11q)), 2. bon (-5/5q-, del(20q), del(12p), double anomalie dont del(5q)), 3. intermédiaire (i(17q), +21, +8, +19, del(7q), clones indépendants, doubles anomalies sans -7/7q-, autres anomalies), 4. mauvais (anomalies 3q, complexe (≥ 3 anomalies), monosomie 7, doubles anomalies avec monosomie 7), 5. très mauvais (complexe avec plus de 3 anomalies) [8].

Un score pronostique international a été établi, tenant compte de la cytogénétique mais aussi de la leucoblastose médullaire et des cytopénies (tableau 8.2). En fonction des groupes de risque (associés à une durée médiane de survie), la conduite thérapeutique sera adaptée.

Perspectives

Les nouveaux outils diagnostiques comme l'hybridation génomique comparative et des polymorphismes nucléotidiques : CGH/SNP « array », le séquençage

Tableau 8.2. Myélodysplasies : score pronostique international (IPSS, pour *International Prognostic Scoring System*).

Critères			Points		
	0	0,5	1	1,5	2
Leucoblastose médullaire	< 5	5–10		11–20	21–30
Cytogénétique	Favorable	Intermédiaire	Défavorable		
Cytopénies	0 ou 1	2 ou 3			
Groupes de risque	Score				
Faible	0				
Intermédiaire 1	0,5–1				
Intermédiaire 2	1,5–2				
Élevé	2,5–3				

Recommandations de l'European Leukemia Net 2014 [8]. Un caryotype est dit complexe lorsqu'il comporte trois ou plus de trois anomalies non apparentées.

à haut débit ont et vont encore isoler de nouveaux marqueurs.

Le chemin peut être long entre la description d'une nouvelle anomalie et la compréhension d'un mécanisme physiopathologique, entre la description d'une mutation et la confirmation de son caractère pathogène, entre la mise en évidence de modifications épigénétiques et ses conséquences sur la transcription de gènes « cibles » impliqués dans la leucémogenèse.

Points clés,
hémopathies malignes

• La caractérisation génétique des hémopathies fait partie intégrante de la démarche diagnostique de toute hémopathie maligne : les données génétiques doivent être replacées dans le contexte clinicobiologique. Le

marqueur identifié permettra d'évaluer la maladie résiduelle et interviendra dans la stratification pronostique.

- Lors d'un remaniement de structure identifié en cytogénétique, deux principaux modèles moléculaires ont été décrits : la constitution de gènes de fusion (modèle de la LMC) ou la recombinaison d'un oncogène avec des *enhancers* de gènes fortement exprimés dans les lymphocytes conduisant à une surexpression ou une expression ectopique de cet oncogène (modèle du lymphome de Burkitt).
- Neuf catégories de gènes sont actuellement reconnues dans leur implication dans la leucémogenèse myéloïde : gènes codant pour un facteur de transcription (modèle avec transcrit de fusion) (18 %), le gène codant pour la nucléophosmine (*NPM1*) (27 %), un gène suppresseur de tumeur (16 %), un gène impliqué dans la méthylation de l'ADN (44 %), dans une voie de signalisation (59 %) ou dans la configuration chromatinienne (22 %), codant pour un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse myéloïde (22 %) ou impliqué dans le complexe cohésine (13 %) ou d'épissage (14 %).

Cytogénétique des tumeurs solides

Dans les tumeurs solides, on identifie les tumeurs épithéliales (les carcinomes et les adénocarcinomes), les tumeurs mésoenchymateuses bénignes comme les lipomes ou malignes comme les sarcomes, les tumeurs des séreuses et des tumeurs neuroectodermiques cutanées et du système nerveux central (SNC).

Les altérations que l'on met en évidence sont des anomalies somatiques acquises, le plus souvent sporadiques qui peuvent, dans les syndromes de prédisposition, se surajouter à des anomalies constitutionnelles. Ainsi, dans 5 % des cas, on peut retrouver un syndrome de prédisposition avec des mutations constitutionnelles comme la mutation de *RB*

dans les formes familiales de rétinoblastome (modèle de Knudson), la mutation de *WNT1* dans les néphroblastomes, ou de gènes de réparation de l'ADN comme *ATM*, *FANC*, *TP53* dans les syndromes d'instabilité chromosomique...

Les cellules cancéreuses sont supposées très instables avec l'acquisition de nouvelles anomalies de manière aléatoire. En fait, ces cellules acquièrent des réarrangements qui leur donnent un avantage sélectif soit en leur donnant un avantage prolifératif, soit une résistance aux mécanismes d'apoptose et/ou de mort cellulaire *via* le gain ou la suppression de fonction d'oncogène ou de suppresseurs de tumeur. Comme en hématologie, on va retrouver :

- soit la juxtaposition d'un gène impliqué dans la prolifération cellulaire (oncogène ou inhibiteur d'apoptose) et d'un gène actif Ex t(8;14) avec *cMYC* et *IGH*;
- soit la fusion de deux parties de gènes aboutissant à la production d'une protéine de fusion :
 - le gène amont (5') fournit un promoteur et un domaine fonctionnel,
 - le gène aval (3') fournit un domaine de liaison à l'ADN.

Moins fréquemment, il peut être observé l'expression constitutive d'une tyrosine kinase ou d'un facteur de croissance « chimériques », comme décrit dans la plupart des hémopathies, mais aussi dans certains sarcomes de l'enfant et adulte jeune, des tumeurs neuroectodermiques.

Dans la majorité des cas (carcinomes et la plupart des sarcomes), c'est une accumulation d'anomalies qui va aboutir à l'oncogenèse de la tumeur. Dans une minorité de cas, une anomalie va d'emblée faire entrer dans la carcinogénèse (sarcomes de l'enfant et adulte jeune, tumeurs neuroectodermiques, certains carcinomes, etc.).

D'un point de vue cytogénétique, on peut distinguer les tumeurs avec délétion ou monosomie entraînant la perte de suppresseur de tumeur tel que le rétinoblastome (perte *RB1*), les carcinomes à cellules claires du rein (perte *VHL*), le néphroblastome (*WT1*) des tumeurs avec gain ou amplification. Les gains peuvent être des duplications ou des polysomies parfois importantes (jusqu'à 8 ou 10 copies). Cela peut être une polyploidie. Les tumeurs pseudotriploïdes sont de bon pronostic. Les amplifications peuvent être de faible niveau (3 à 10 copies) ou de forte amplitude (jusqu'à 100 copies). Elles peuvent concerner un gène (*MYCN*, *MYC*, *ALK*) ou un gène de fusion (*PAX7/FOX1A*, *COL1A/PDGF*).

L'identification de ces anomalies permet une meilleure compréhension des mécanismes de transformation maligne. Elle est une aide à la prise en charge. Elles contribuent à la classification des tumeurs. Leur mise en évidence peut être utile à des fins cliniques quand elles sont spécifiques, pronostiques et surtout thérapeutiques avec l'essor de la médecine personnalisée.

Techniques d'étude

Le caryotype

Si le caryotype a été une technique précieuse qui a permis historiquement l'identification de la majorité de ces anomalies, c'est une technique difficile, sujette à des contraintes pratiques, comprenant plusieurs étapes qui vont du recueil du prélèvement dans des conditions stériles au transport dans du milieu permettant la survie des cellules tumorales jusqu'à la mise en culture de ces cellules afin d'obtenir des cellules en division et leur analyse au stade de métaphase. Le temps de culture est variable en fonction du type tumoral et du type de culture (en suspension ou culture de cellules adhérentes). Il peut aller de 72 heures à 15 jours.

Certaines tumeurs sont difficiles à faire pousser *in vitro*. Les échecs de culture sont assez fréquents. Les fibroblastes du microenvironnement peuvent proliférer mieux que les cellules tumorales.

Son interprétation pose problème. Comment interpréter un caryotype sans anomalie ? Est-ce une cellule tumorale ou une cellule du microenvironnement ? Certaines anomalies comme les amplifications sont difficiles à identifier. Contrairement aux hémopathies, les tumeurs solides sont souvent polyclonales et leur caryotype peut être extrêmement complexe avec de multiples anomalies non identifiables. Beaucoup de tumeurs sont polyploïdes.

La sensibilité de cette technique n'est pas bonne (10 Mb environ) mais elle permet une analyse globale cellule par cellule des altérations.

Si le caryotype hématologique est très répandu dans les laboratoires de cytogénétiques, celui des tumeurs solides l'est peu. Il est supplanté par les techniques de cytogénétique moléculaire comme la FISH, notamment sur coupe en paraffine et la CGH-array.

La FISH

Elle peut être réalisée de première intention ou en complément du caryotype ou du profil moléculaire par CGH-array. Elle peut être réalisée sur préparation cytogénétique, apposition, empreinte, cryocoupe ou coupe en paraffine. Ces dernières ont l'avantage de garder l'architecture tumorale ce qui peut être précieux en cas de faible cellularité tumorale tout en permettant des études rétrospectives.

C'est la technique de choix pour la recherche d'amplification. Mais chaque gène à son critère d'amplification et il faut se méfier des fortes polysomies qui peuvent exister dans certaines tumeurs si on utilise des critères n'intégrant pas une sonde contrôle.

La CGH-array

C'est une étude globale du génome qui ne révèle que les variations du nombre de copies du génome, notamment les amplifications par rapport à un niveau médian. Un contrôle histologique de la cellularité tumorale de l'échantillon utilisé est nécessaire et généralement, un minimum de 50 % de cellules tumorales est requis. Des techniques se développent pour l'utiliser sur paraffine. Elle ne permet de visualiser ni les translocations ni le caractère polyclonal des tumeurs.

En 2011, un phénomène appelé chromothripsis a été décrit par Stephens *et al.* [9] suite à une technique de NGS. Il s'agit d'une catastrophe mitotique qui engendre une multitude de microremaniements (duplication, inversion, délétion) intéressant un (le plus souvent) mais parfois jusqu'à quatre chromosomes ou régions chromosomiques. Ils ont estimé la fréquence de ce phénomène dans les tumeurs à 2,5 % (et 5 % des tumeurs osseuses) en regardant le profil moléculaire par CGH-array. La théorie de l'accumulation progressive d'anomalies est remise en question par ce processus. Cela a été corrélé à un mauvais pronostic dans certaines tumeurs.

Cytogénétique diagnostique

Les tumeurs bénignes

Les tumeurs bénignes peuvent avoir des remaniements comme des translocations, des trisomies ou des monosomies (tableau 8.3) [10].

Les sarcomes

Les sarcomes représentent 1 % des tumeurs solides malignes. Leur diagnostic clinique et histologique est souvent difficile du fait de leur rareté, de leur grande hétérogénéité avec plus de 60 types histologiques différents et de l'existence de tumeurs mésenchymateuses bénignes pour lesquelles le diagnostic différentiel n'est pas évident, peu de marqueurs immuno-histochimiques permettant de les différencier.

On peut distinguer trois groupes de sarcomes en fonction de leur génomique. Les deux premiers groupes représentent 30 à 35 % des sarcomes :

- profil génétique simple : le caryotype n'a révélé que peu de chromosomes remaniés principalement des translocations engendrant des gènes de fusion (tableau 8.4).

Tableau 8.3. Quelques tumeurs bénignes avec leurs remaniements caractéristiques et les gènes impliqués.

Histologie	Remaniement	Gène impliqué
Adénome pléomorphe de la parotide	t(3;8)(p21;q12)	CTNNB1/PLAG1
Lipoblastome	t(8;...)(q12)	PLAG1
Lipomes	t(12;...)(q15;...) t, inv(6;...)(p21;...) t, del(13)(q12-22...)	HMGA2 HMGA1
Léiomyomes utérins	t(12;14)(q15;q24)	HMGA2
Exostoses	del(8)(q24.1) del(11)(p11-12)	EXT1 EXT2
Méningiomes, schwannomes	-22	NF2
Fibrome de l'ovaire	+12	
Tumeur desmoïde...	+8, +20	

- profil génétique intermédiaire : le caryotype en apparence simple masque des anomalies moléculaires reflétant une certaine complexité. Par exemple, on peut avoir sur le caryotype la présence d'un seul chromosome anormal souvent un anneau surnuméraire. Ces anneaux sont généralement constitués de plusieurs copies des gènes de fusion qui les caractérisent (ex. : COL1A1-PDGFB dans le *Dermatofibrosarcoma protuberans* de Darier-Ferrand) ou des séquences amplifiées provenant de plusieurs chromosomes qui s'intriquent de manière complexe avec cependant la présence d'une anomalie caractéristique au sein de cette complexité (ex. : amplification de MDM2 dans les liposarcomes bien différenciés) (tableau 8.5) [10].

- profil génétique complexe. L'analyse du caryotype de ces tumeurs est peu informative du fait de sa complexité. Grâce à l'utilisation de techniques de cytogénétique moléculaire telles que la CGH array, en intégrant bien sûr le contexte clinique et histologique, certaines tumeurs d'aspect indifférencié ont pu être classées. Ainsi, un profil plat fera rechercher un sarcome « à translocation », la présence d'une amplification de MDM2 peut permettre d'orienter vers un liposarcome peu différencié ou indifférencié, un profil très complexe se verra dans une tumeur de haut grade. Certaines anomalies peuvent donner une indication sur l'histologie même si elle n'est pas totalement spécifique.

Tableau 8.4. Exemple de sarcomes à génétique simple ou intermédiaire avec le remaniement et les gènes impliqués.

Histologie	Remaniement	Gène impliqué
Génétique simple		
Sarcome d'Ewing	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG
Sarcome à cellules claires	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1
Tumeur desmoplastique à petites cellules rondes	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN
Liposarcome myxoïde	t(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP
	t(12;22)(q13;q12)	EWS-DTIT3
Histiocytome fibreux angiomatoïde	t(12;16)(q13;p11)	FUS-ATF1
Rhabdomyosarcome	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1
Alvéolaire	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FOXO1
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	t(9;17)(q22;q11)	TAF2N-CHN
Synoviosarcome	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX1, 2
Fibrosarcome congénital	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	t(2p23)	ALK
Sarcome alvéolaire des parties molles	t(X;17)(p11;q25)	ASPL-TFE3
Sarcome stromal endométrial de bas grade	t(7;17)(p15;q21)	JAZF1-JJAZ1
Génétique intermédiaire		
<i>Dermatofibrosarcoma protuberans</i> de Darier-Ferrand	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
Liposarcome bien différencié	Amplification 12q15	MDM2 CDK4

Tableau 8.5. Anomalies chromosomiques des carcinomes rénaux.

Histologie	Remaniement	Gène impliqué
Carcinome papillaire de type 1	+7, +17, -Y	
Carcinome à cellules claires	-3p	Perte VHL
Carcinomes à cellules chromophobes	Hypodiploïdie -1,-2,-6,-10, -13,-17,-21	
Carcinomes à translocation	Xp11.2 t(6;11)(p21;q12)	TFE3 TFEB*

La présence de ces remaniements peut être détectée indirectement par l'immunohistochimie.

Les carcinomes

Bien que représentant la quasi-totalité des tumeurs, la cytogénétique des carcinomes trop complexe est peu utilisée

pour le diagnostic. Depuis l'essor des techniques moléculaire, elle l'est dans un but pronostic et surtout thérapeutique à la recherche de cible thérapeutique.

Les carcinomes à cellules rénales sont cependant une exception puisque des remaniements simples ont été corrélés à l'histologie [11].

Pronostic

Les carcinomes

La présence d'amplifications géniques est inversement corrélée au pronostic des tumeurs d'une manière générale. L'amplification de certains oncogènes se retrouve dans plusieurs types tumoraux, comme par exemple MYC qui peut être amplifié notamment dans les médulloblastomes, les cancers du sein, de la prostate... [12]

Le pronostic n'est pas toujours corrélé à la complexité du profil génétique de la tumeur. Si les profils complexes

sont plutôt un facteur péjoratif, des tumeurs agressives peuvent avoir des cytogénétiques peu remaniées (ex. : cancer du rein).

Le neuroblastome

C'est l'exemple même d'une tumeur dont le pronostic est fortement lié à la génétique. La prise en charge des enfants peut varier d'une surveillance à une chimiothérapie intensive avec greffe de moelle. Ainsi, on va rechercher une amplification de MYCN par FISH et faire un profil moléculaire par CGH-array. L'amplification de MYCN est le facteur le plus péjoratif avec une survie médiane de 18 mois en cas d'amplification. Les anomalies numériques (gain et perte de chromosomes entiers) sans autres remaniements se voient dans des tumeurs peu agressives. La présence d'anomalies segmentaires (c'est-à-dire intéressant des segments de chromosome) est le facteur pronostic de rechute le plus fort [13]. Même si on ne cible pas une altération génétique, la prise en charge est cependant personnalisée en fonction de la génomique.

Médecine personnalisée

Amplification de *HER2*

HER2 est une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase qui a été montrée surexprimée dans 9 à 30 % des cancers du sein. Une immunohistochimie *HER2* doit être réalisée afin d'obtenir un score. S'il est de 0 ou 1, les patientes n'ont pas de traitement. S'il est de 2, une recherche d'amplification du gène doit être réalisée par FISH ou CISH. Les critères d'amplification ont été définis par l'ASCO en 2007 et revus en 2013. Pour les 3+ et celles amplifiées par une autre technique, on proposera un traitement par un anticorps ciblant la protéine [14]. Ce gène est amplifié dans d'autres cancers comme l'estomac, le bas œsophage, dans une moindre mesure dans les cancers du poumon, etc.

Remaniement de *ALK* ou *ROS1*

Les remaniements de *ALK* (pour *anaplastic lymphoma kinase*) ont d'abord été mis en évidence dans les lymphomes anaplasiques comme son nom l'indique. En 2007, cela a été montré dans le poumon, plutôt dans des adénocarcinomes du sujet jeune non-fumeur avec une fréquence allant de 5 à 10 %. Dans le poumon, on a le plus souvent une inversion paracentrique du chromosome 2 avec comme partenaire

EML4. Cela entraîne une dimérisation du domaine tyrosine kinase avec activation [15]. Ce remaniement peut être présent dans d'autres tumeurs (cancer médullaire de la thyroïde, adénocarcinome du côlon, etc.). *ALK* peut également être amplifié, rarement dans le poumon mais dans le sein et le neuroblastome. Enfin, des mutations sont décrites notamment dans le neuroblastome [16].

Plus récemment et dans la même population, des remaniements de *ROS1* ont été mis en évidence chez 1,5 à 2,5 % des patients [14].

Ces deux altérations ont une thérapie ciblée, actuellement le crizotinib mais des molécules de seconde génération sont en cours de développement [17].

FGFR1

FGFR1 peut être amplifié dans beaucoup de cancers aux premiers rangs desquels celui du sein, les carcinomes épidermoïdes du poumon, des cancers ORL, etc. La FISH permet de mettre en évidence ces amplifications de même que la CGH-array. Plusieurs inhibiteurs existent, dont le ponatinib, le dovitinib, etc. [18, 19]

Autres

La liste des cibles thérapeutiques dans les tumeurs solides évolue en permanence en fonction des données biologiques et cliniques. Comme altération, on a des mutations, des amplifications et quelques translocations et plus rarement des délétions. La CGH-array permet de rechercher ces amplifications en une seule technique, même si elle reste moins sensible que la FISH. D'autres techniques comme le NGS, voire la détection d'ADN circulant, sont utilisées [20, 21].

Les techniques sont parfois refaites dans l'évolution des tumeurs en cas de récides ou de progression, éventuellement pour voir l'évolution d'une cible mais surtout pour en rechercher de nouvelles.

Points clés, tumeurs solides

La cytogénétique est une aide diagnostique, surtout dans les sarcomes à génétique simple ou intermédiaire. La plupart ont une translocation ou une amplification caractéristique que l'on recherche par des techniques de cytogénétique moléculaire.

Pour les carcinomes dont le caryotype est souvent très complexe en dehors des cancers du rein, la cytogénétique est surtout utilisée pour rechercher des facteurs pronostiques et des cibles actionnables.

Le suivi n'est pas fait pour les tumeurs solides. C'est la recherche de nouvelles cibles qui motivent la réalisation de nouvelles techniques.

Conclusion générale

Le rôle de la cytogénétique oncologique reste important. Face aux bouleversements technologiques auxquels elle est confrontée, il est intéressant de reprendre ce qu'écrivait Roland Berger [22] en introduction d'un numéro de *Pathologie biologique* datant de 2003 mais toujours d'actualité : « La cytogénétique hématologique, comme Janus, a deux faces, l'une tournée vers la recherche fondamentale, l'autre vers l'application à la pratique médicale de l'hématologie » ; « la cytogénétique est l'illustration exemplaire d'une discipline scientifique qui, utilisant d'abord des données recueillies à partir d'une pathologie, pourra féconder d'autres sciences biologiques pour permettre ensuite un retour vers des applications médicales ».

Références

- [1] Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology : <http://atlasgeneticsoncology.org>.
- [2] Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer; 2012. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- [3] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. 4th ed. Lyon : IARC; 2008.
- [4] Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; 481(7382) : 506–10.
- [5] The cancer genome atlas research network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368 : 2059–74.
- [6] Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013. *Blood* 2013; 122(6) : 872–84.
- [7] Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. European Leukemia Net. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia : recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2006; 108(6) : 1809–20.
- [8] Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120(12) : 2454–65.
- [9] Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144(1) : 27–40.
- [10] Fletcher CD, Bridge JA, Hogendoorn PC, et al. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. 2013.
- [11] Moch H. An overview of renal cell cancer : pathology and genetics. *Cancer Biol* 2013; 23(1) : 3–9.
- [12] Tseng YY, Moriarty BS, Gong W, et al. PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature* 2014; 512(7512) : 82–6.
- [13] Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27(7) : 1026–33.
- [14] Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer : a review and update. *Adv Anat Pathol* 2014; 21(2) : 100–7.
- [15] Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18(3) : 378–81.
- [16] Schleiermacher G, Javanmardi N, Bernard V, et al. Emergence of new ALK mutations at relapse of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2014; 32(25) : 2727–34.
- [17] Rothschild SI, Gautschi O. Crizotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2013; 14(5) : 473–80.
- [18] Dienstmann R, Rodon J, Prat A, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway : opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol* 2014; 25(3) : 552–63.
- [19] Jiang T, Gao G, Fan G, et al. FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma : a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 2015; 87(1) : 1–7.
- [20] Mendelsohn J. Personalizing oncology : perspectives and prospects. *J Clin Oncol* 2013; 31(15) : 1904–11.
- [21] Kalia M. Biomarkers for personalized oncology : recent advances and future challenges. *Metabolism* 2015; 64(3 Suppl 1) : S16–21.
- [22] Berger R. Évolution d'un agent double : la cytogénétique en hématologie. *Pathol Biol* 2003; 51(6) : 305–6.

ENTRAÎNEMENT 8 QCM-QCS

Hémopathies malignes

QCS 1

La translocation chromosomique t(9;22)(q34;q11) et la leucémie myéloïde chronique. Parmi les propositions suivantes, une proposition est fautive. Laquelle ?

A. Elle induit une dérégulation de l'activité tyrosine kinase du gène Abelson (ABL)

B. Elle modifie l'adhésion cellulaire à l'actine

C. On peut observer des anomalies clonales surajoutées à la t(9;22) sur le caryotype du diagnostic

D. Dans 5 % des cas, la translocation t(9;22)(q34;q11) peut être « masquée »

E. La translocation t(9;22)(q34;q11) est uniquement mise en évidence dans la leucémie myéloïde chronique

QCS 2

Un caryotype est effectué sur des cellules prélevées par ponction de moelle osseuse dans le cadre du diagnostic d'une leucémie aiguë myéloblastique. Une proposition est fautive :

Cette analyse :

- A.** Est importante pour évaluer le pronostic de cette pathologie
- B.** Contribuera à l'évaluation de l'efficacité du traitement chimiothérapique si un remaniement de structure ou une anomalie de nombre sont mis en évidence lors du diagnostic
- C.** Peut aussi mettre en évidence une anomalie cytogénétique constitutionnelle si l'individu est porteur d'une anomalie cytogénétique constitutionnelle équilibrée
- D.** Permet de mettre en évidence une duplication interne de séquence intragénique

Tumeurs solides

QCM 1

Concernant la cytogénétique des sarcomes :

- A.** Tous les sarcomes ont une génétique complexe
- B.** EWSR1 peut avoir différents partenaires de translocation engendrant des histologies différentes
- C.** Seule la recherche de translocation est indispensable à leur diagnostic
- D.** La FISH est une aide précieuse au diagnostic des différents types histologiques

QCM 2

La CGH-array :

- A.** Permet de rechercher des cibles thérapeutiques
- B.** A une valeur pronostique
- C.** Peut être faite sur n'importe quel échantillon
- D.** Permet de mettre en évidence un chromothripsis

QCM 3

Les caryotypes des tumeurs solides :

- A.** Sont difficile à obtenir
- B.** Ceux des carcinomes sont plus simples que ceux des sarcomes
- C.** Peuvent être faussement normaux
- D.** Peuvent paraître faussement simple

QCS 1

Les anomalies dans les tumeurs solides :

- A.** Sont toujours sporadiques
- B.** Sont toujours monoclonales
- C.** Concernent souvent la ploïdie et la triploïdie peut être un facteur pronostique favorable
- D.** La présence d'une anomalie signe la malignité

Divers

QCM 1

- A.** Une même molécule peut cibler plusieurs altérations
- B.** Les anti-HER2 sont des anticorps qui vont se fixer sur le récepteur membranaire
- C.** Les carcinomes à cellules claires du rein sont caractérisés par un remaniement de *TFE3*
- D.** Seules les anomalies de nombre constituent des cibles thérapeutiques

Génétique moléculaire

PLAN DE LA PARTIE

Anomalies génétiques à l'échelle du gène	103
Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène	117
Le séquençage de nouvelle génération : principe, applications en diagnostic et perspectives	133

This page intentionally left blank

Anomalies génétiques à l'échelle du gène

Béatrice Parfait, Éric Pasmant, Dominique Vidaud, Michel Vidaud

PLAN DU CHAPITRE

Les différents types de mutations	104
Conséquences des mutations	107
Unicité ou diversité des mutations	112
Interprétation des variations identifiées	113
Conclusion	114
L'essentiel de la question	114



Prérequis

Le terme d'anomalie génétique (ou mutation au sens large) désigne tout changement du matériel héréditaire survenant soit dans la lignée germinale (mutations germinales), soit dans les cellules somatiques (mutations somatiques) et associé à des conséquences délétères. Seules les mutations germinales peuvent être transmises à la descendance et sont à l'origine des maladies héréditaires. Les mutations sont spontanées dans la majorité des cas, mais elles peuvent également être induites par exposition à des agents mutagènes.

Il est possible de distinguer trois grandes classes de mutations :

- les mutations nucléotidiques par remplacement d'une base;
- les insertions/délétions de quelques nucléotides incluant les expansions de répétitions trinucleotidiques;
- les remaniements géniques qui regroupent les grandes délétions et insertions, duplications, inversions, conversions géniques ou translocations chromosomiques.

Les différents types de mutations

Substitution nucléotidique

Les transitions correspondent à la substitution (remplacement) d'une base pyrimidique (C ou T) ou purique (A ou G) par une autre base de même nature. Les transversions correspondent au remplacement d'une base purique par une base pyrimidique ou inversement.

Les transitions sont en moyenne deux fois plus fréquentes que les transversions, alors que l'inverse serait attendu si le changement de bases s'effectuait au hasard. En effet, chaque base peut théoriquement subir deux transversions et seulement une transition. L'excès de transition est probablement dû en partie à la combinaison de propriétés des ADN polymérases (incorporations erronées plus fréquentes d'une base de même nature lors de la réplication) et de celle des systèmes de correction (une incorporation erronée de type transversion entraîne une anomalie de la double hélice beaucoup plus importante et plus efficacement reconnue par les systèmes de correction qu'une transition).

Parmi les transitions, celles concernant le dinucléotide CpG vers TpG ou CpA sont largement surreprésentées dans presque toutes les maladies génétiques. Elles rendent

compte en moyenne, d'un tiers des substitutions de bases. Le dinucléotide CpG est donc un véritable point chaud de mutation.

Les dinucléotides CpG sont la cible fréquente d'une modification enzymatique physiologique de l'ADN : la méthylation. Celle-ci n'affecte en effet que le carbone 5 d'une cytosine au sein du dinucléotide CpG. Par ailleurs, au sein de l'ADN, la cytosine non méthylée est susceptible d'être désaminée en uracile par une désaminase : la présence d'un uracile, constituant anormal de l'ADN est détectée efficacement par un mécanisme d'excision (uracile DNA glycosylase). Si la désamination concerne la cytosine méthylée, cette dernière est transformée en thymine, erreur qui sera moins efficacement détectée. Ainsi, une séquence nucléotidique incluant un dimère CpG, peut subir, après désamination oxydative de la 5-méthylcytosine, une transition C > T lorsque le brin codant est concerné par la modification ou bien, une transition G > A lorsque le brin transcrit est concerné par la modification (e-figure 9.1). En effet, même si la modification se produit sur le brin transcrit, c'est le changement sur le brin codant qui est considéré.



Petites délétions ou insertions

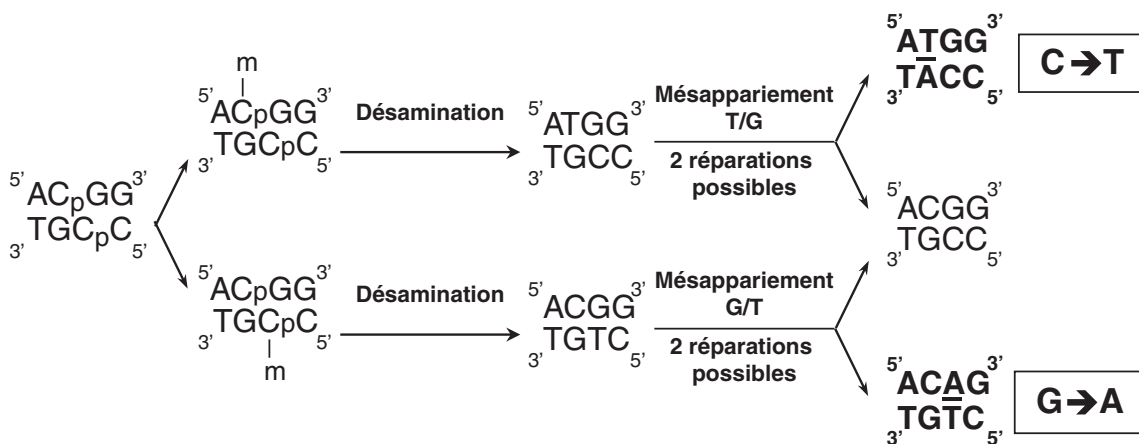
Les délétions ou insertions d'un ou quelques nucléotides sont également des mutations fréquentes. Lorsqu'elles concernent un nombre de nucléotides non multiple de trois dans un exon, elles conduisent à un décalage du cadre de lecture (*frameshift*) qui aboutit à l'apparition d'un codon STOP prématuré et à la présence d'une protéine tronquée (la plupart du temps non fonctionnelle), sauf dans les cas de délétions ou d'insertions d'un ou plusieurs codons (c'est-à-dire d'un nombre de nucléotides multiple de trois).

Elles surviennent souvent au niveau de courtes répétitions en tandem, très probablement par un mécanisme de dérapage (*slippage*) de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN.

Grandes délétions, duplications ou inversions

Divers types d'ADN répété représentent une large partie du génome humain. Ces séquences participent à l'architecture et la complexité du génome mais prédisposent également à des remaniements parfois délétères, suivant différents mécanismes.

Les répétitions en tandem d'un court motif de 1 à 4 nucléotides représentent des points chauds (*hotspots*) de dérapage réplicatif, cause de courtes insertions/délétions



e-figure 9.1

Mécanisme d'apparition des transitions au sein du dimère CpG.

(voir plus loin, paragraphe « Expansion de triplets » et [chapitre 22, « Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques »](#)).

Des insertions ou délétions de taille plus importante sont également souvent médiées par des répétitions (les remaniements d'échelle encore supérieure sont traités dans le paragraphe « Réarrangements chromosomiques » et le [chapitre 6, « Cytogénétique conventionnelle »](#)). Ces répétitions présentes en un faible nombre de copies au sein du génome (*low copy repeats*, LCR) sont à l'origine d'échanges de matériel génétique. Différentes familles de LCR peuvent être distinguées : les LCR dupliquées en tandem ou dispersées. Les délétions de tout ou partie d'un gène sont la cause minoritaire de nombreuses maladies mais sont particulièrement représentées dans certaines maladies comme, par exemple, la myopathie de Duchenne (60 % des cas) ou l'amyotrophie spinale (90 % des cas).

Deux LCR très similaires situées sur le même bras chromosomique peuvent donner lieu à un mésappariement des répétitions non-alléliques. Le mécanisme, impliquant deux séquences pratiquement identiques (paralogues) peut être soit une recombinaison homologue survenant lors d'un *crossing-over* inégal (NAHR pour *non-allelic homologous recombination*; [e-figure 9.2](#)), soit un échange entre chromatides sœurs ([e-figure 9.3](#)), voire une recombinaison intrachromatidienne ([e-figure 9.4](#)). Lorsque la délétion survient entre des séquences ne présentant pas de similarité, on parle de recombinaison non homologue ou « illégitime ».

Expansion des triplets

Depuis 1991, il a été montré qu'un type inattendu de mutations instables (mutations dynamiques) par expansions de triplets était responsable d'un certain nombre de maladies dont la liste n'est pas close. La plupart d'entre elles sont des maladies neurodégénératives (par exemple, le retard mental avec X fragile, la dystrophie myotonique de Steinert ou la chorée de Huntington). Les mécanismes de ces mutations dynamiques sont détaillés dans le [chapitre 22, « Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques »](#), du présent ouvrage.

Leur mode de transmission présente pour la plupart d'entre elles des caractéristiques très inhabituelles avec un biais de transmission parentale des formes les plus sévères. Au fur et à mesure des générations, la maladie est de plus en plus précoce avec des manifestations cliniques de plus

en plus graves (phénomène connu sous le nom d'anticipation). Les expansions de triplets peuvent survenir à différents niveaux :

- région 5' non codante (région 5'UTR) du gène (CGG et X fragile);
- région 3' non codante (CTG et dystrophie myotonique de Steinert);
- dans un exon avec apparition de poly-glutamines associées à des manifestations cliniques neurologiques (CAG dans la maladie de Huntington, le syndrome de Kennedy et les ataxies spinocérébelleuses);
- dans un intron (GAA et ataxie de Friedreich).

Il est généralement admis qu'au-delà d'un certain seuil de longueur (environ 50 répétitions), les répétitions formeraient des structures anormales de type épingles à cheveux ou triple hélice, perturbant la réplication et favorisant les dérapages ou glissements réplicatifs.

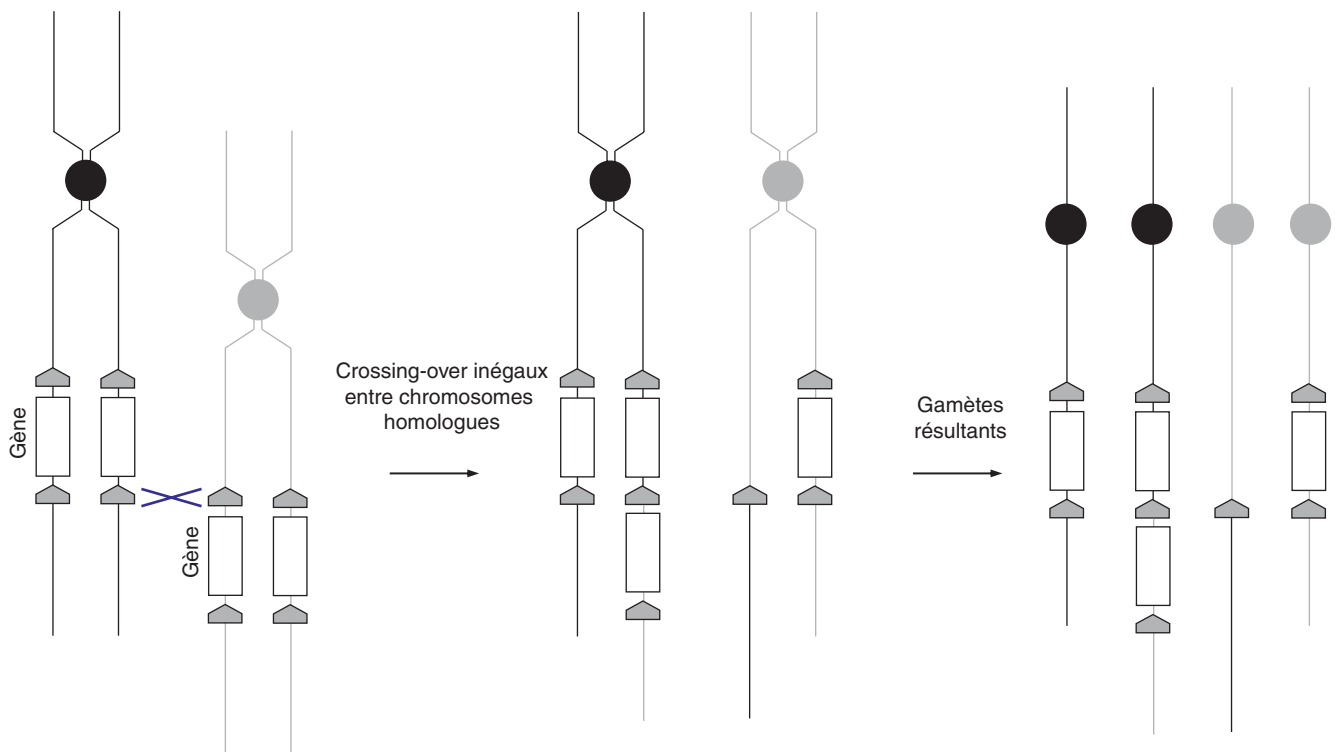
Mécanismes rares (insertions, conversions géniques, anomalies chromosomiques)

Insertion de séquences répétées dispersées

Le génome humain contient un grand nombre de séquences répétées dispersées, notamment les séquences courtes (300 pb) de type *Alu* (qui font partie des *SINE*, pour *short interspersed elements*) et des séquences plus longues de 3 à 7 kb (famille *LINE*, pour *long interspersed elements*), toutes deux dérivées de rétrotransposons. L'insertion de ces séquences se produit après la rétrotranscription d'ARN issu de très rares copies actives de ces éléments, mécanisme qui paraît relativement peu actif dans le génome humain actuel. En effet, parmi les milliers de mutations indépendantes caractérisées pour des maladies telles que les hémophilies A et B, la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne, très rares sont les événements de mutation dus à de telles insertions. Cependant, lorsque ces dernières sont exoniques, elles interrompent la séquence codant une protéine. Des cas d'insertions introniques affectant l'épissage ont également été décrits.

Conversion génique

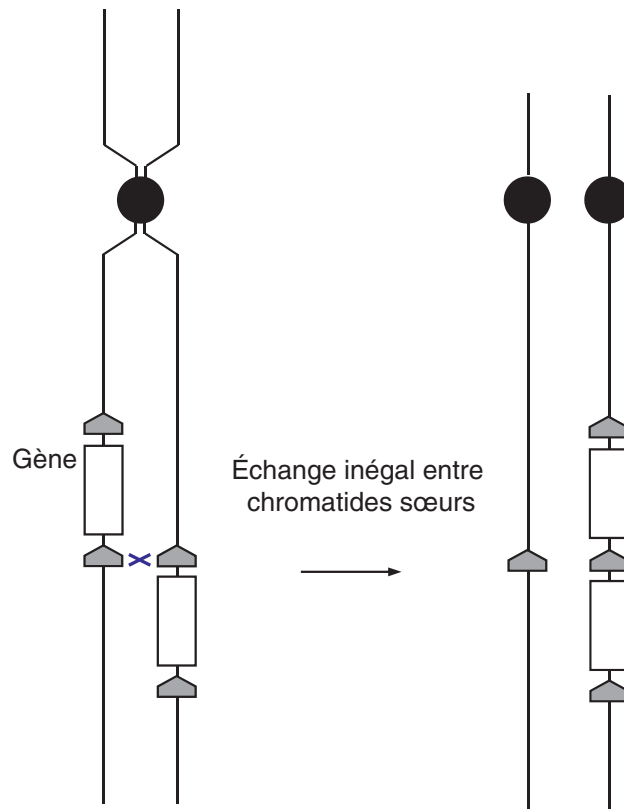
Lorsque des séquences homologues sont à proximité l'une de l'autre dans le génome, un mécanisme de transfert localisé non réciproque (à la différence du *crossing-over* inégal) – identifié initialement chez la levure et appelé conversion



e-figure 9.2

Crossing-over inégaux entre chromosomes homologues.

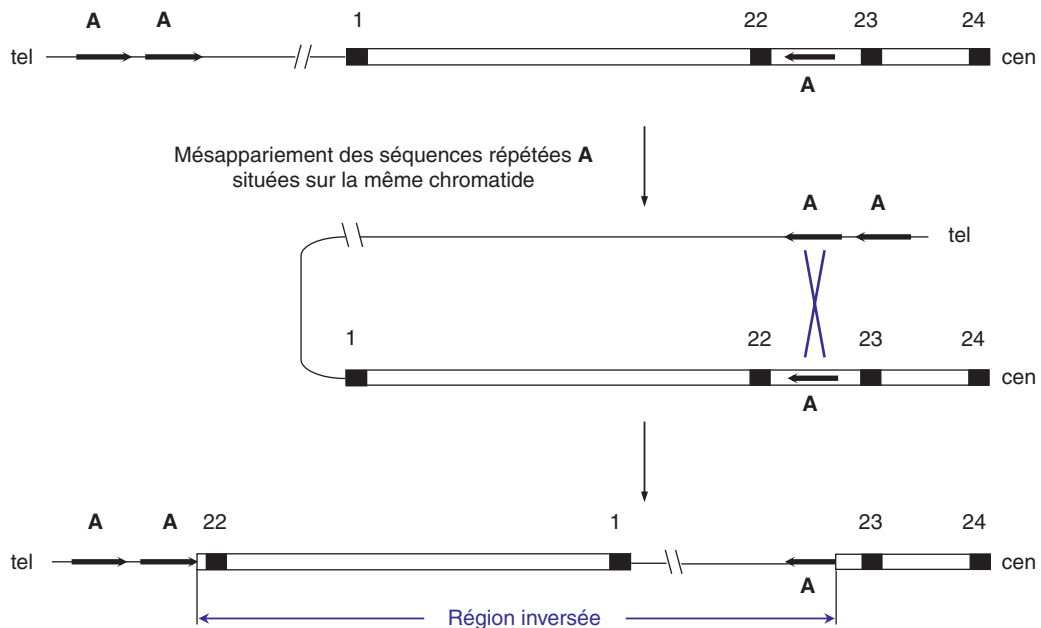
Sur ce schéma, les chromosomes homologues sont repérés par la couleur de leur centromère. Le gène (rectangle blanc) est flanqué de séquences répétées directes (en gris). La recombinaison inégale (NAHR, pour *non-allelic homologous recombination*) entre deux chromosomes homologues peut conduire à la délétion ou la duplication du gène.



e-figure 9.3

Recombinaison inégale entre chromatides sœurs.

Le gène (rectangle blanc) est flanqué de séquences répétées directes (en gris). La recombinaison inégale entre chromatides sœurs peut conduire à la délétion ou la duplication du gène.



e-figure 9.4

Recombinaison intrachromatidienne : exemple du gène F8.

Le gène *F8* est schématisé par un rectangle blanc. Seuls les exons 1, 22, 23 et 24 sont représentés (rectangles noirs). Les séquences paralogues A sont répétées en aval du versant télomérique du gène *F8*. Une troisième séquence A orientée en antisens par rapport aux deux autres est présente au sein de l'intron 22. La recombinaison entre deux séquences A, l'une télomérique et la seconde dans l'intron 22 est à l'origine de l'inversion récurrente partielle du gène conduisant à la perte de sa fonction. Cette mutation récurrente du gène *F8* codant le facteur VIII de la coagulation rend compte de près de la moitié de cas d'hémophilies A sévères.

génique – peut entraîner dans le gène « receveur » une série de changements nucléotidiques répartis sur une région assez courte. Dans certains cas, la séquence donneuse est un pseudogène inactivé par l'accumulation de mutations et le transfert unidirectionnel d'une de ces mutations inactive le gène receveur.

Par exemple, le gène *CYP21A2* codant la stéroïde 21-hydroxylase présente un pseudogène (*CYP21AP*) situé à proximité et incluant de nombreux variants perte de fonction. Environ 75 % des cas de déficits en 21-hydroxylase (responsables d'une hyperplasie congénitale des surrénales) sont causés par des *crossing over* inégaux ou des échanges inégaux entre chromatides sœurs, liés à l'importante similarité de séquence entre *CYP21A2* et *CYP21AP*. Cet échange réciproque de matériel peut aboutir à des délétions de *CYP21A2* ou à la formation d'un gène hybride non fonctionnel entre *CYP21A2* et *CYP21AP*. Dans environ 25 % des cas, des mutations délétères de *CYP21A2* sont causées par à un mécanisme de conversion génique conduisant à l'introduction unidirectionnelle de variants perte de fonction de *CYP21AP* vers *CYP21A2*.

Réarrangements chromosomiques

Enfin, des réarrangements chromosomiques comme des translocations équilibrées peuvent inactiver un gène si l'un des points de cassure est situé à l'intérieur de ce gène (voir chapitre 6, «Cytogénétique conventionnelle»). Ces réarrangements sont très rares mais importants à mettre en évidence car ils permettent de localiser très précisément et d'identifier le gène de la maladie en question.

Les délétions de toute une région chromosomique peuvent enfin être associées à des phénotypes dits de gènes contigus (car causés par la délétion simultanée de plusieurs gènes contigus) de types syndromes complexes (par exemple, le syndrome de DiGeorge ou vélocardiofacial causé par une délétion de la région 22q11.2) ou entraînant une association de phénotypes monogéniques identifiables (voir chapitre 6, «Cytogénétique conventionnelle»).

Le cas particulier des disomies uniparentales (DUP : présence chez un même individu diploïde de deux chromosomes homologues hérités d'un même parent) est spécifiquement traité dans le chapitre 21, «Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées», du présent ouvrage.

La mise en évidence des DUP est fondée sur l'étude des polymorphismes génétiques (microsatellites) puisque le caryotype est normal. En effet, la comparaison à un locus donné du génotype du *propositus* et de ses deux parents

permet de mettre en évidence la double contribution de l'un des parents et la non-contribution de l'autre.

Les conséquences des DUP sont variées et en rapport avec des mécanismes divers :

- une isodisomie uniparentale peut faire apparaître une maladie récessive alors que seul l'un des deux parents est hétérozygote pour l'allèle délétère;
- une DUP, lorsqu'elle porte sur un territoire soumis à empreinte parentale, peut engendrer une pathologie si elle exclut le gène parental actif.

L'empreinte parentale est une modification épigénétique (méthylation des cytosines des dinucléotides CpG) de certains gènes en fonction de leur origine parentale. En effet, cette méthylation s'accompagne d'une inactivation transcriptionnelle qui est spécifique de l'origine paternelle ou maternelle du gène et conduit donc à une hémizygotie fonctionnelle (expression mono-allélique) maternelle ou paternelle. Un gène est soumis à l'empreinte maternelle s'il est inactivé lorsqu'il est transmis par la mère et un gène est soumis à l'empreinte paternelle s'il est inactivé lorsqu'il est transmis par le père.

Chez l'homme, on estime que 100 à 200 gènes sont soumis à empreinte parentale. L'empreinte parentale possède les propriétés suivantes :

- elle doit être initialisée avant la fécondation à des stades où les deux génomes sont séparés;
- elle est effacée au cours de la gamétogenèse afin qu'un chromosome transmis par un père à sa fille, qui porte donc une empreinte paternelle, puisse au niveau des gamètes de cette fille porter une empreinte maternelle et inversement;
- elle doit pouvoir être transmise de façon stable lors des divisions cellulaires;
- elle doit pouvoir réguler l'expression des gènes afin d'aboutir à une expression mono-allélique.

Mutations *de novo*, mosaïques germinales et mosaïques somatiques

Un petit nombre de mutations, dites *de novo* ou néo-mutations, survient dans la lignée germinale au cours des divisions mitotiques durant la spermatogenèse ou l'ovogenèse ou pendant la méiose elle-même. Pour certaines maladies, la fréquence d'apparition de mutations *de novo* peut être très importante (33 % des cas pour la myopathie de Duchenne ou l'hémophilie A, 50 % des cas pour la neurofibromatose de type I, 90 % des cas pour l'achondroplasie).

Une maladie due à une mutation *de novo* ne récidive habituellement pas dans la fratrie. Cependant, a été décrit le cas de parents de phénotype normal ayant plus d'un enfant atteint (neurofibromatose de type I, ostéogénèse imparfaite). Pour expliquer ces observations, il faut supposer que l'un des parents est porteur d'une mosaïque germinale et qu'il existe en fait un clone de cellules germinales porteur de la mutation (donc un risque de récurrence).

Les mosaïques somatiques sont dues à des mutations survenues après fécondation (postzygotique), à un stade plus ou moins tardif de l'embryogenèse (figure 9.5). Leurs conséquences cliniques dépendent de la nature de la mutation, du gène altéré et du tissu concerné. Elles constituent très probablement l'une des causes de l'hétérogénéité d'expression clinique des maladies héréditaires. Si la mosaïque somatique touche les cellules germinales d'un sujet, la maladie peut alors être transmise à sa descendance.

Conséquences des mutations

Perte de fonction

Les mutations peuvent entraîner une perte totale ou partielle d'expression de la protéine ou la synthèse d'une protéine partiellement ou totalement inactive : on parle alors de perte de fonction. Dans cette situation, il faut distinguer les allèles « amorphes » ou « nuls », responsables de la perte totale d'expression de la protéine ou de la synthèse d'une protéine totalement inactive, et les allèles « hypomorphes » responsables de la perte partielle d'expression de la protéine ou de la synthèse d'une protéine partiellement inactive. Ce type de mutation est retrouvé dans la majorité des maladies récessives qui nécessitent pour se manifester une atteinte des deux allèles. Elles sont également retrouvées dans les maladies dominantes dites « par haplo-insuffisance », la perte de 50 % de l'activité du gène étant suffisante pour entraîner un phénotype clinique. Il y a un effet de dosage génique : la présence d'un seul allèle fonctionnel ne permet pas de compenser l'absence de l'autre. L'hypercholestérolémie familiale, dont la forme hétérozygote est beaucoup moins sévère que la forme homozygote, en est un exemple.

Lorsqu'une maladie est liée à la perte totale ou partielle de fonction, on retrouve en général un grand nombre de mutations différentes pouvant affecter les différentes étapes de l'expression d'un gène (figure 9.6).

Mutations affectant la régulation de la transcription

Anomalies de régulation en cis

Une mutation délétère localisée dans le promoteur d'un gène peut, par plusieurs mécanismes, affecter l'expression de ce gène. Les méthodes mises en œuvre pour explorer précisément les conséquences de ces anomalies moléculaires reposent sur des expériences d'expression *in vitro* de gènes rapporteurs. Tout type de mutation peut être rencontré (mutations ponctuelles, délétions ou insertions de plus ou moins grande taille, inversions, etc.) et de nombreux exemples sont décrits en pathologie humaine. La mutation peut altérer un site consensus de liaison à un ou plusieurs facteurs de transcription, diminuant voire abolissant l'expression génique. La mutation du promoteur peut également altérer sa structure, entraînant la modification négative ou positive de l'expression du gène par l'intermédiaire de structures secondaires.

En dehors des régions promotrices, les mutations peuvent altérer d'autres éléments agissant en *cis* pouvant se situer à plusieurs centaines voire plusieurs milliers de paires de bases en 5' ou 3' du gène (*long range regulatory elements*). Ces séquences régulatrices de courte taille *enhancers* ou *silencers* sont capables de fixer des facteurs de transcription, souvent tissu-spécifiques, et entraînent respectivement l'activation ou l'inhibition de la transcription en participant à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle (figure 9.6).

Lorsque l'unité transcriptionnelle et le promoteur d'un gène sont intacts, son expression peut également être altérée par un « effet de position » en changeant son environnement chromatinien habituel. Cet effet de position peut être la conséquence de remaniements tels que des translocations, délétions, insertions ou inversions. Le réarrangement peut séparer le gène d'éléments régulateurs distants de type *enhancer* ou *silencer* ou bien, au contraire, placer à proximité d'un gène l'*enhancer* ou le *silencer* d'un autre gène.

Un effet de position s'observe également lors de la délétion de LCR (pour *locus control region*). Présents en différents endroits du génome, ces éléments de grande taille peuvent exercer leur effet à de très grandes distances sur l'expression de *clusters* entiers de gènes (figure 9.6). Ils semblent définir des domaines dans lesquels la structure chromatinienne permet aux facteurs de transcription d'accéder à leurs sites de fixation sur l'ADN, entraînant l'activation de la transcription. À titre d'exemple, la délétion du LCR placé à plus de 60 kb en amont du cluster β -globine est une des causes de β -thalassémie.

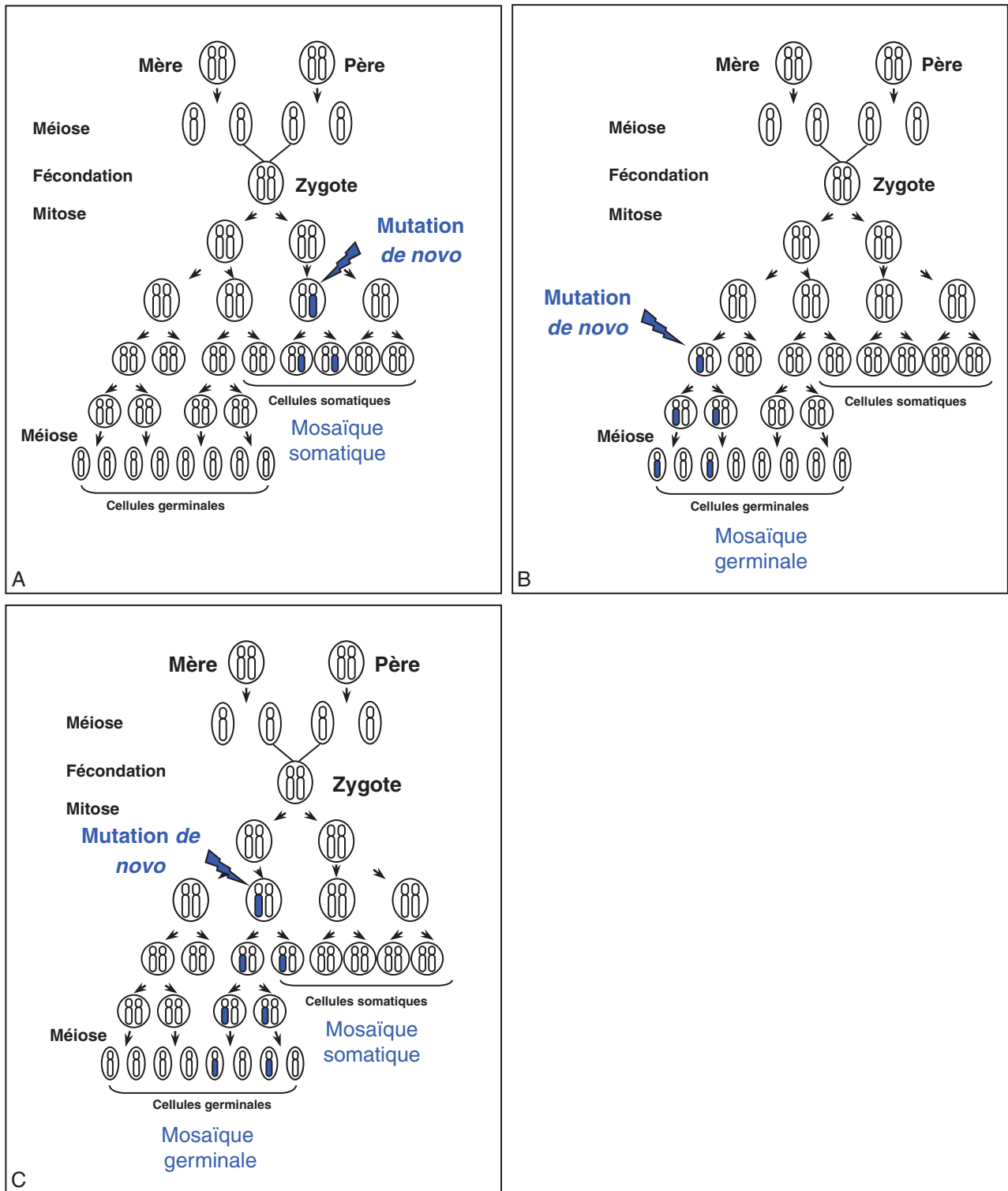


Figure 9.5

L'état de mosaïque correspond à la coexistence chez un même individu de deux populations cellulaires distinctes issues d'un même zygote.

En fonction du stade auquel a lieu l'événement mutationnel postzygotique, la mosaïque peut être restreinte à la lignée somatique (A), germinale (B) ou affecter les deux lignées (C).

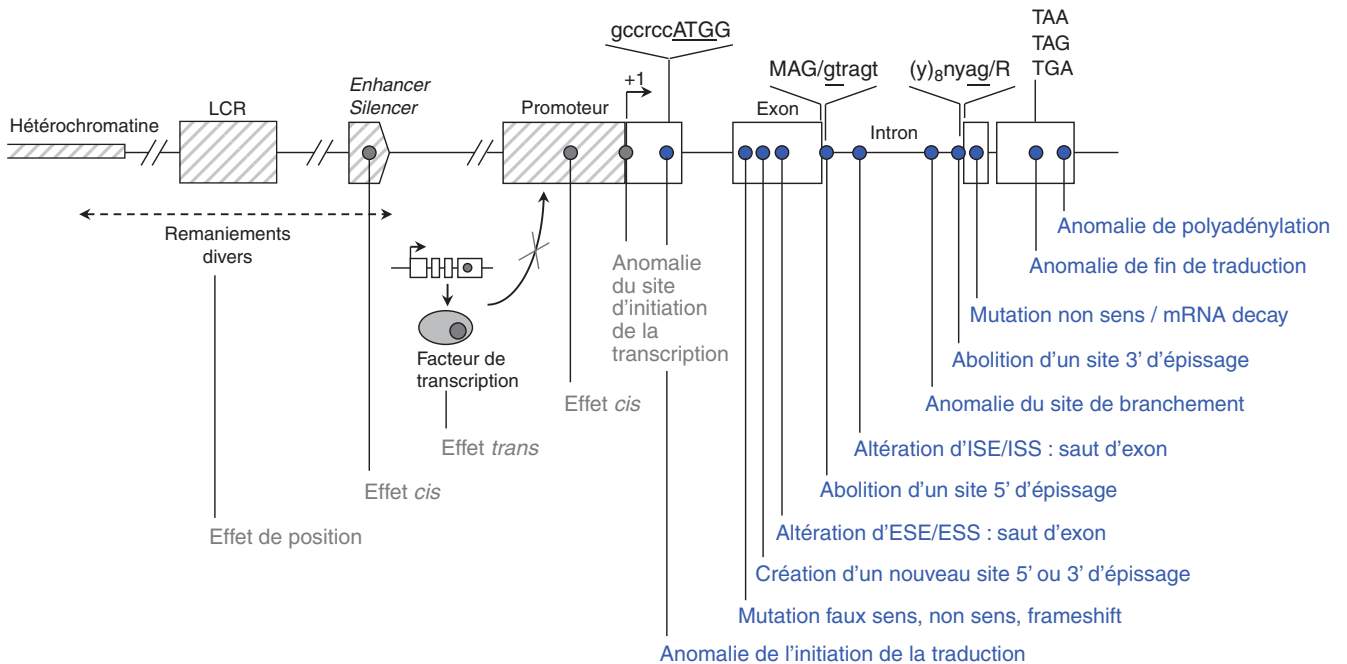


Figure 9.6

Principales mutations ponctuelles pouvant toucher un gène et leurs conséquences (schéma adapté de Hanna et al. 2005).

Les exons du gène sont représentés par des rectangles blancs. Les séquences impliquées dans la régulation de l'expression du gène sont représentées par des rectangles hachurés en gris. LCR : locus control region; ESE : exonic splicing enhancers; ESS : exonic splicing silencers.

M : A ou C; R : G ou A; n : a, t, g ou c; r : g ou a; y : t ou c.

Anomalies de régulation en trans

Des mutations de gènes codant des facteurs de transcription peuvent également être la cause d'anomalies de la transcription (figure 9.6). La plupart de ces mutations sont létales ou associées à des anomalies du développement. Un exemple intéressant concerne les mutations du gène *MECP2* impliquées dans le syndrome de Rett, grave désordre neurologique lié à l'X. La protéine MecP2 (pour methyl-CpG-binding protein) se lie spécifiquement aux îlots CpG méthylés des promoteurs de nombreux gènes et agit comme un répresseur transcriptionnel. Les mutations de *MECP2* conduisent ainsi à l'abolition de cette régulation négative.

Mutations affectant la maturation du pré-messager en ARNm

Les mutations d'épissage peuvent abolir l'épissage d'un exon en modifiant les séquences consensus des sites introniques donneurs et accepteurs d'épissage mais également le site de branchement intronique (figure 9.7). Des mutations en dehors de ces sites particuliers peuvent également dévoiler des sites cryptiques d'épissage conduisant à l'épissage partiel d'exon. Des altérations de séquences consensus exoniques favorisant ou réprimant l'épissage de l'exon qui

les inclut, les ESE (pour exonic splicing enhancers) et les ESS (pour exonic splicing silencers) peuvent également être responsables d'anomalies de l'épissage (figure 9.7). ESE et ESS ont leurs homologues introniques (ISE, pour intronic splicing enhancers et ISS, pour intronic splicing silencers), mais leurs séquences consensus sont moins bien définies et leur implication en pathologie n'a été que rarement rapportée. Les mutations de la maturation du pré-messager peuvent plus rarement toucher le site de polyadénylation et être responsables d'une diminution de la stabilité de l'ARNm. Par exemple, plusieurs mutations du signal de polyadénylation du gène *HBA2* codant l' $\alpha 2$ -globine ont été décrites à l'origine d' α -thalassémies essentiellement dans les populations du bassin méditerranéen.

Mutations affectant la traduction

Les mutations non-sens (substitutions aboutissant à la formation de l'un des trois codons stop : UAA, UAG, UGA), mutations frameshift (décalage du cadre de lecture lié à des insertions ou délétions dans un exon d'un nombre de nucléotides non multiple de trois, aboutissant à un codon stop prématuré) et mutations du codon d'initiation de la traduction entraînent généralement l'absence de formation d'une protéine ou la formation d'une protéine

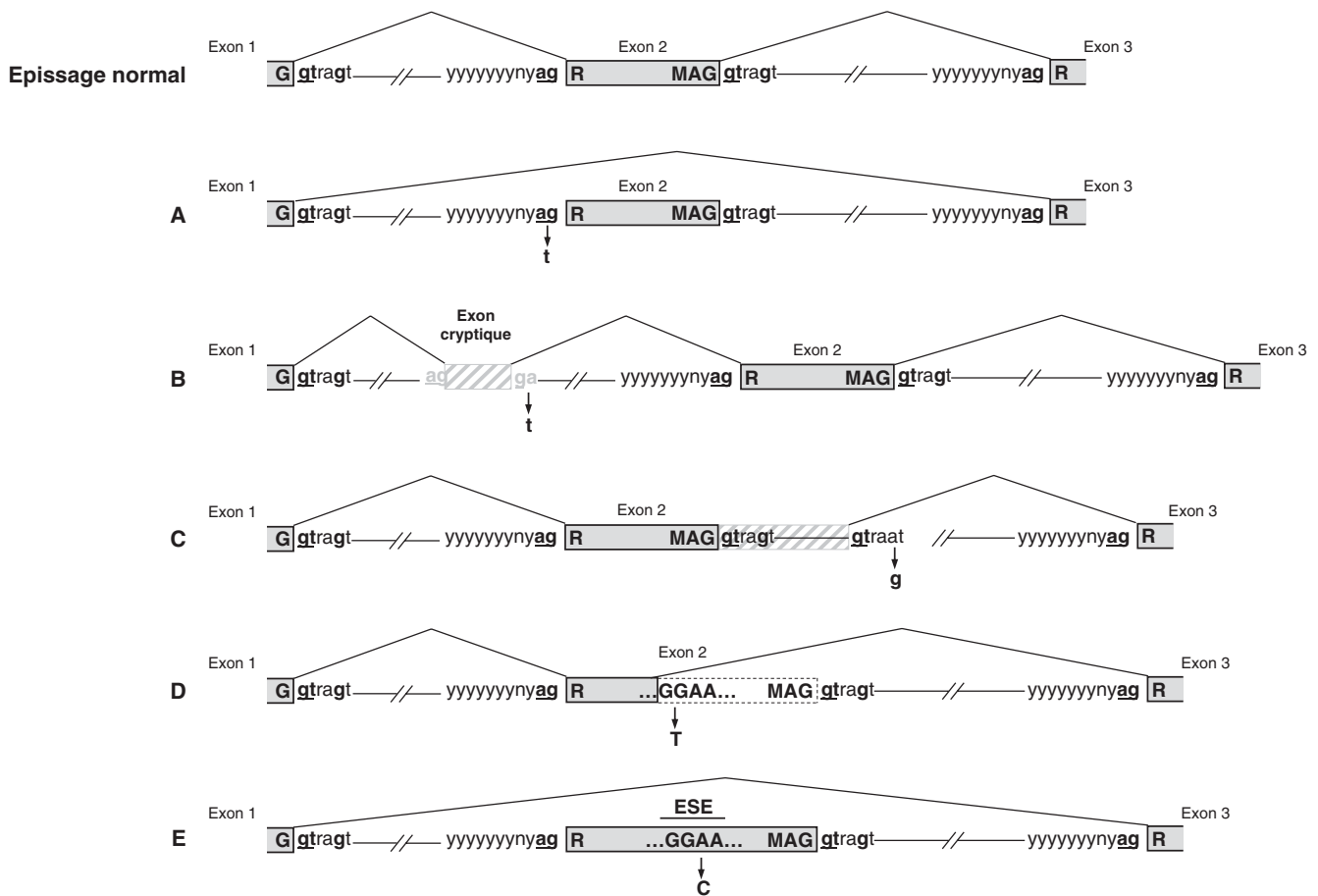


Figure 9.7

Mutations affectant la maturation des ARN pré-messagers.

Les exons sont représentés par les rectangles. Les séquences exoniques sont en lettres majuscules et les séquences introniques en lettres minuscules. La flèche indique l'anomalie de séquence affectant l'épissage.

A : mutation d'un site consensus d'épissage. L'épissage de l'ARN pré-messager est altéré au niveau de l'exon situé à proximité du site muté : un saut d'exon (*exon skipping*) est observé la plupart du temps.

B : mutation intronique entraînant l'activation d'un site cryptique d'épissage. Une région intronique, dénommée « exon cryptique », est alors retenue lors de l'épissage de l'ARN pré-messager.

C : mutation intronique créant un nouveau site consensus d'épissage préférentiellement utilisé conduisant à la rétention d'une séquence intronique.

D : mutation exonique créant un nouveau site consensus d'épissage préférentiellement utilisé conduisant à l'épissage d'une séquence exonique lors de la maturation du transcrit.

E : mutation exonique affectant un site de reconnaissance de facteur protéique (*exonic splicing enhancer* [ESE] ou *exonic splicing silencer* [ESS]) impliqué dans l'épissage : le saut d'exon (*exon skipping*) est observé la plupart du temps.

M : A ou C ; R : G ou A ; n : a, t, g ou c ; r : g ou a ; y : t ou c.

tronquée dont l'activité fonctionnelle est nulle ou très réduite. Une mutation non-sens peut avoir pour conséquence une dégradation de l'ARNm par un mécanisme de type *nonsense-mediated decay* (NMD). Lors de l'épissage normal, des complexes protéiques (EJC, pour *exon-junction complexes*) se fixent en amont des extrémités 3' de chaque exon de l'ARNm et sont retrouvés aux jonctions exon-exon de l'ARNm mature. Le premier ribosome à traduire l'ARNm déplace ces complexes. La présence d'un codon stop pré-

maturé (mutation non-sens) avant le dernier exon, conduit à une persistance de la liaison des complexes exoniques de jonction situés en aval, signal pouvant dans certains cas induire une destruction de l'ARNm.

Les mutations faux sens sont responsables d'un changement d'acide aminé. Elles peuvent affecter la stabilité, l'adressage intracellulaire, la maturation (modifications post-traductionnelles) de la protéine, son assemblage dans une structure multimérique, les sites importants pour

l'activité enzymatique, les interactions fonctionnelles avec des ligands et d'autres protéines. Lorsqu'un changement faux sens est survenu, il peut être difficile de distinguer une mutation pathologique d'une simple variation nucléotidique, sans effet fonctionnel, mais qui serait rare dans la population étudiée.

Les variations synonymes (isosémantiques ou silencieuses) sont liées au caractère redondant du code génétique : plusieurs codons peuvent correspondre à un même acide aminé. L'absence de changement d'acide aminé laisserait supposer une absence de conséquence fonctionnelle. Cependant, pour une minorité de variations « synonymes », un effet délétère a pu être montré avec une altération de l'épissage dans la majorité des cas.

La fréquence des événements mutationnels entraînant une perte de fonction dépend en partie de la taille de la cible (taille de la séquence codante, nombre d'exons, nombre d'acides aminés importants pour la fonction de la protéine) et de l'existence de points (ou régions) chauds de mutation. Dans certains cas, la perte totale de fonction est létale et seules sont admises les pertes partielles. C'est le cas notamment, pour le déficit en G6PD, pour lequel il n'existe que des mutations faux sens maintenant une activité enzymatique résiduelle (allèle hypomorphe).

Récemment, des mutations constitutionnelles (anomalies du développement) ou somatiques (cancers sporadiques) de gènes de la chromatine ont été décrites. Ces mutations affectent notamment des protéines catalysant les modifications post-traductionnelles des histones ou la méthylation de l'ADN. Les conséquences épigénétiques conduisent à l'altération de l'expression d'un grand nombre de gènes. À titre d'exemple, des mutations constitutionnelles du gène *EZH2* ont été décrites dans le syndrome de Weaver. Ces mutations entraînent une anomalie de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, marque chromatinienne associée à une chromatine inactive sur le plan transcriptionnel. Des mutations somatiques du gène *EZH2* et des anomalies de la marque chromatinienne H3K27me3 ont également été décrites dans plusieurs types de cancers sporadiques.

Gain de fonction

Les mutations associées à un gain de fonction sont plus restreintes. On en distingue plusieurs types.

Effet dominant négatif

Les mutations à effet dominant négatif affectent la fonction de l'allèle normal chez les hétérozygotes. De

telles mutations caractérisent les gènes codant les protéines de structure ou capables de former des homo- ou des hétérodimères. Elles entraînent des modifications conformationnelles qui affectent la fonction de la protéine normale. C'est le cas de certaines mutations responsables de l'ostéogénèse imparfaite qui affecte les gènes codant les chaînes $\alpha 1$ (*COL1A1*) et $\alpha 2$ (*COL1A2*) du collagène de type I. Une mutation affectant la structure d'une chaîne de collagène (délétion d'un ou de plusieurs exons) exerce à l'état hétérozygote un effet plus délétère (dominant) qu'une perte totale d'expression (mutations récessives) car elle empêche une association correcte de la sous-unité raccourcie aux chaînes normales.

Acquisition d'une nouvelle fonction

C'est par exemple le cas de la mutation faux sens p.Met358Arg (variant *Pittsburg*) du site actif de l' $\alpha 1$ -antitrypsine ($\alpha 1$ -AT). Cette enzyme inhibe normalement l'élastase leucocytaire. Le nouveau variant *Pittsburg* perd ses propriétés anti-élastase pour devenir un puissant inhibiteur des facteurs de coagulation de type sérine protéase et plus particulièrement de la thrombine. En conséquence, les patients porteurs de cette mutation présentent un syndrome hémorragique.

Surexpression

En génétique constitutionnelle, il est exceptionnel que le gain de fonction soit lié à une surexpression. L'augmentation de la quantité de protéine faisant suite à une duplication génique est un mécanisme retrouvé pour la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A où la surexpression de *PMP22* provoque une myélinogenèse anormale.

En oncogénétique somatique, la surexpression d'oncogènes est décrite dans de nombreux types tumoraux (voir [chapitre 8, «Anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides»](#)). Par exemple, environ 15 % des cancers du sein s'accompagnent d'une surexpression de *HER2* qui est associée à un pronostic plus défavorable. Dans les cancers, de nombreux mécanismes moléculaires peuvent être à l'origine d'une expression somatique anormale de gènes *drivers* de la tumorigénèse dont notamment des mécanismes épigénétiques (déméthylation de l'ADN, modifications post-traductionnelles des histones). Des mutations somatiques récurrentes «gain de fonction» du promoteur du gène *HTERT* (codant la télomérase) ont été décrites dans plusieurs types de cancers chez l'homme.

Modification des propriétés fonctionnelles, production d'une protéine toxique

Dans d'autres cas, les propriétés fonctionnelles sont modifiées, notamment pour les hémoglobines dont l'affinité pour l'oxygène est augmentée ou diminuée, ou pour la mutation p.Gly380Arg du *FGFR3* codant un récepteur du FGF (pour *fibroblast growth factor*) et responsable de l'achondroplasie. Cette mutation paraît entraîner une activation constitutive du récepteur.

Le gain et la perte de fonction du même gène induisent des phénotypes différents

Exemple du gène *RET*

Le gène *RET* code un récepteur de la membrane cellulaire. Lorsque son ligand, GDNF, se lie au domaine extracellulaire du récepteur, il induit la dimérisation du récepteur qui transmet alors le signal à la cellule par l'intermédiaire du domaine intracellulaire à fonction tyrosine kinase.

Un grand nombre de mutations « perte de fonction » ont été rapportées interférant avec la maturation post-traductionnelle de la protéine RET. Ces mutations sont une des causes de la maladie de Hirschsprung, maladie héréditaire dominante autosomique.

Certaines mutations très spécifiques de type faux sens sont retrouvées dans des maladies totalement différentes, comme les cancers familiaux médullaires de la thyroïde. Ces mutations sont des mutations « gain de fonction » produisant un récepteur qui se lie de manière excessive au ligand ou reste actif de manière constitutive et se dimérise même en l'absence du ligand.

Unicité ou diversité des mutations

Certaines maladies sont caractérisées par une mutation unique, d'autre part une mutation prédominante, d'autres enfin par une extrême hétérogénéité allélique (par exemple, plus de 600 mutations différentes sont décrites pour la mucoviscidose).

Mutation unique

Une mutation est unique ou très prépondérante lorsqu'une modification fonctionnelle très précise de la protéine ou de l'expression du gène est responsable de la maladie (drépanocytose, achondroplasie, maladie de Huntington, maladie de Steinert).

Ces mutations uniques peuvent avoir différentes origines : il a été possible de déduire de l'étude des haplotypes autour du gène de la chaîne β de la globine que cinq mutations fondatrices, survenues il y a 2 000 à 3 000 ans, sont à l'origine des millions de porteurs de l'allèle HbS responsable de la drépanocytose.

Mutations prépondérantes

Les mutations prépondérantes sont expliquées soit par l'existence d'un point chaud de mutations récurrentes dans le gène (inversion dans l'hémophilie A, délétions dans l'amyotrophie spinale) ou, plus fréquemment, par un effet fondateur ou une dérive génétique, en général dans une population donnée (mutation p.Phe508del de la mucoviscidose, thalassémie).

On parle d'effet fondateur quand une nouvelle population est créée à partir d'un nombre restreint d'individus (fondateurs) provenant d'une population existante. Par simple effet d'échantillonnage, la composition génétique de la nouvelle population peut fortement différer de celle de la population d'origine. Cette variation d'échantillonnage induite par la scission de population est appelée « effet fondateur ».

Les mutations à l'origine de nombreuses maladies monogéniques rares ont été identifiées dans des populations humaines dites « à effet fondateur » car fondées par un groupe d'individus d'effectif restreint et restées isolées pendant plusieurs générations. Différents arguments suggèrent en effet l'existence, dans ces populations, d'un ancêtre commun à la majorité voire l'ensemble des malades. Cet ancêtre portait une mutation délétère et l'a transmise à sa descendance. Les malades partagent alors une région du génome autour de la mutation, ce qui facilite l'identification des gènes impliqués dans ces maladies (cartographie par homozygotie). L'effet fondateur peut ainsi expliquer la diffusion importante, par hasard, de certains allèles pour tant délétères dans des populations particulières.

Mutations hétérogènes

Une très grande hétérogénéité de mutations est pratiquement la règle (hors effet fondateur) dans les maladies par perte de fonction : on parle d'hétérogénéité allélique. Les cas extrêmes d'hétérogénéité des mutations sont illustrés par la plupart des maladies sévères liées à l'*X* ou par les maladies autosomiques dominantes affectant l'efficacité reproductrice des patients. Dans ces cas, les mutations sont « perdues » en quelques générations et on ne retrouve que des mutations « privées », spécifiques de chaque famille. Le spectre de ces mutations reflète alors directement la sensibilité du gène à différents mécanismes mutationnels.

Il faut distinguer l'hétérogénéité allélique et l'hétérogénéité de locus :

- l'hétérogénéité allélique ou intralocus qui rend compte du fait qu'une maladie, quel que soit son mode héréditaire, peut être due à des mutations délétères différentes d'un même gène. C'est le cas habituellement des maladies récessives et des maladies dominantes dites « par haplo-insuffisance »;
- l'hétérogénéité interlocus se traduit par le fait qu'un phénotype apparemment identique peut être la conséquence de mutations délétères siégeant dans des gènes différents non alléliques : une maladie/plusieurs gènes différents (non alléliques).

Pour un certain nombre de maladies héréditaires, des bases de données sont accessibles sur Internet, la principale étant OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man* du National Centre of Biotechnologies Informations (NCBI : www.ncbi.nlm.nih.gov/omim; voir [chapitre 24](#), « Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique »).

Interprétation des variations identifiées

Un enjeu majeur de l'analyse en génétique moléculaire réside dans l'interprétation des variations identifiées; c'est-à-dire la capacité à distinguer une mutation (variation d'ADN délétère) d'un polymorphisme ou d'un variant rare (variant présentant une MAF, pour *minor allele frequency* < 1 %). Lorsque la variation de séquence est une délétion/insertion nucléotidique conduisant à un décalage du cadre de lecture ou un variant non-sens, les conséquences délétères sur la fonctionnalité de la protéine semblent claires. En revanche, le caractère délétère d'un variant nucléotidique faux sens ou d'une courte insertion/délétion en phase est moins évident. Plusieurs éléments (génétiques, informatiques, expérimentaux) doivent être pris en compte afin de mettre en évidence le caractère causal d'une mutation dans une pathologie.

Ségrégation

L'apparition d'un variant *de novo* (néomutation) chez un sujet atteint issu de parents sains non porteurs du variant est un critère majeur, très en faveur de l'implication de ce variant dans la pathologie. Dans une présentation familiale, la co-ségrégation du variant avec le phénotype est également un argument en faveur du caractère délétère du variant.

Fréquence du variant

L'absence du variant chez un grand nombre de sujets contrôles non atteints est en faveur de son caractère délétère mais ne permet pas d'exclure qu'il s'agisse d'un variant rare non pathogène. Le variant identifié peut également être recherché dans les bases de données de polymorphismes (dbSNP : www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) et de mutations (HGMD, pour *Human Gene Mutation Database* : www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php; LOVD, pour *Leiden Open Variation Database* : www.lovd.nl/3.0/home), disponibles sur Internet (voir [chapitre 24](#), « Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique »).

Prédiction des effets du variant sur la fonction protéique

Il convient d'étudier si le variant de séquence est situé au sein d'une région ou d'un domaine essentiel à la fonction de la protéine, dans la mesure où ces régions sont connues. La modification importante de la polarité et de la charge de l'acide aminé concerné, son encombrement stérique, peuvent également être des facteurs à prendre en compte. Une prédiction *in silico* des conséquences sur la protéine peut être réalisée à l'aide de logiciels dédiés dont certains sont d'accès libre en ligne (voir [chapitre 24](#), « Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique »).

Conservation interespèces

La localisation du variant au sein d'une séquence très conservée par l'évolution est un argument d'implication.

Données expérimentales

L'étude couplée du gène et de son transcrit peut permettre de mettre en évidence une altération de la transcription ou de l'épissage. Dans la mesure du possible, l'étude des conséquences de la mutation sur la fonction de la protéine pourra être réalisée *in vitro* sur des modèles cellulaires. L'analyse *in vivo* par l'étude de modèles animaux permet enfin de signifier le caractère causal de la mutation.

La description des variants génétiques identifiés répond à une nomenclature internationale recommandée par l'Human Genome Variation Society (HGVS, www.hgvs.org/mutnomen/recs.html). Cette description doit préciser la nature de la séquence modifiée par une lettre minuscule :

- « g. » : séquence génomique;
- « c. » : séquence ADN complémentaire, la numérotation débutant (+ 1) sur le codon d'initiation de la traduction;
- « p. » : séquence protéique;
- « m. » : séquence mitochondriale;
- « r. » : séquence ARN.

Il est également indispensable de numéroter la mutation en se référant à une séquence extraite des bases de données en précisant son numéro d'accès et sa version (ex. : NM_004006.1, Nomenclature de transcrit, NCBI Reference Sequence).

Conclusion

L'identification des mutations à l'origine des maladies héréditaires monofactorielles humaines a pris ces dernières années un essor considérable. Il est devenu possible d'établir le spectre des mutations pour une maladie génétique donnée et différents mécanismes mutationnels peuvent être identifiés : insertions, inversions, expansions de répétitions trinuécléotidiques...

La connaissance des anomalies moléculaires a permis de mieux cerner les mécanismes de gain ou de perte de fonction, de comprendre le mode de transmission dominant ou récessif, d'expliquer les phénomènes d'anticipation, d'identifier des effets fondateurs au sein de populations particulières, d'établir des corrélations génotype-phénotype et de mettre à jour une hétérogénéité allélique et génétique.

L'identification des mutations délétères est également à la base du diagnostic génotypique qui occupe actuellement une place prépondérante en matière de conseil génétique et de diagnostic prénatal.

L'implémentation des nouvelles techniques de séquençage à haut débit (NGS, pour *next-generation sequencing*, voir [chapitre 11, « Le séquençage de nouvelle génération »](#)) dans le cadre du diagnostic des maladies héréditaires concourt à l'augmentation du nombre de variations identifiées. L'interprétation des variations ainsi identifiées, c'est-à-dire la détermination de leur caractère causal de la maladie, représente un enjeu majeur de la génétique moléculaire.

L'essentiel de la question

Les mécanismes mis en jeu dans la transmission des maladies héréditaires sont variés. Il peut s'agir de mutations ponctuelles telles que des transitions (dimères CpG) et

des transversions, des délétions/insertions de quelques nucléotides (se produisant entre autres par dérapage réplcatif) mais également des délétions, duplications, inversions de grandes taille (un ou plusieurs exons, gènes complets, voire régions chromosomiques) se produisant la plupart du temps par recombinaison de séquences répétées homologues ou par recombinaison illégitime entre deux séquences non homologues. L'amplification de triplets nucléotidiques est également en cause dans un certain nombre de maladies. Des mécanismes plus rares peuvent intervenir : la conversion génique, l'insertion de séquences répétées dispersées, les réarrangements chromosomiques. Ces mutations peuvent être héritées ou apparaître *de novo* (néomutations), avec un risque possible de transmission à la descendance.

Les conséquences de la présence de ces mutations sont la perte ou le gain de fonction de la protéine codée par le gène muté en cause. On parle de perte de fonction lorsque la mutation entraîne une perte totale ou partielle d'expression du gène ou la synthèse d'une protéine partiellement ou totalement inactive. Les mutations en cause sont variées (hétérogénéité allélique). Elles peuvent être retrouvées au niveau du promoteur ou des séquences régulatrices de l'expression de gènes. Elles peuvent également affecter l'épissage de l'ARNm, sa polyadénylation, sa traduction (mutations faux sens, non-sens ou *frameshift*). La perte de fonction est retrouvée dans la majorité des maladies récessives et dans les maladies dominantes par haplo-insuffisance. On parle de gain de fonction lorsque les mutations en cause présentent un effet dominant négatif (le produit de l'allèle muté affecte la fonction de la protéine codée par l'allèle normal) ou entraîne l'apparition d'une nouvelle fonction, une surexpression ou une modification des propriétés fonctionnelle de la protéine. Les mutations sont plus restreintes, voire uniques dans certaines pathologies.

Bibliographie

- Hanna N, Parfait B, Vidaud D, et al. Mécanismes et conséquences des mutations. *Med Sci* 2005; 21 : 969–80.
- Houdayer C, Stoppa-Lyonnet D. Anomalies de la transcription et diagnostic en génétique constitutionnelle. *Med Sci* 2005; 21 : 170–4.
- Kaplan JC, Delpech M. Biologie moléculaire et médecine. 3^e éd Paris : Flammarion Médecine/Science; 2007.
- Mac Arthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014; 508 : 469–76.
- Strachan T, Goodship J, Chinnery P. Genetics and genomics in medicine. New York : Garland Science, Taylor and Francis Group; 2014.

ENTRAÎNEMENT 9 QCM-QCS

QCM 1

Les techniques de bandes :

- A. Permettent de reconnaître et de classer les chromosomes
- B. Sont lues par un microscope en fluorescence
- C. Les bandes R donnent un marquage inverse des bandes G
- D. La résolution est le nombre de bandes identifiées sur le lot haploïde des chromosomes

QCM 2

Parmi les propositions suivantes concernant les mutations responsables de la perte de fonction d'un gène, lesquelles sont justes ?

- A. Elles sont habituellement retrouvées dans les maladies récessives
- B. Elles sont retrouvées dans les maladies dominantes par haplo-insuffisance
- C. Elles affectent la fonction de l'allèle normal chez les hétérozygotes
- D. Elles sont associées à l'apparition d'une nouvelle fonction de la protéine correspondante
- E. Elles sont associées à la perte totale ou partielle de la fonction de la protéine correspondante

QCM 3

Parmi les événements moléculaires suivants, lesquels peuvent correspondre à une mutation responsable de la perte de fonction d'un gène ?

- A. Délétion totale ou partielle d'un gène
- B. Mutation au sein du promoteur à l'origine de la diminution de l'expression du gène
- C. Insertion de deux nucléotides au sein d'un exon codant
- D. Mutation non-sens
- E. Mutation faux sens

QCM 4

Parmi les propositions suivantes concernant les mutations responsables d'un « gain de fonction », lesquelles sont fausses ?

- A. Elles sont habituellement retrouvées dans les maladies récessives
- B. Elles sont retrouvées dans les maladies dominantes par haplo-insuffisance
- C. Elles affectent la fonction de l'allèle normal chez les hétérozygotes
- D. Elles sont associées à l'apparition d'une nouvelle fonction de la protéine correspondante
- E. Elles sont associées à la perte totale ou partielle de la fonction de la protéine correspondante

QCM 5

L'apparition d'une protéine tronquée peut résulter d'une mutation :

- A. Faux sens
- B. Non-sens
- C. Par décalage du cadre de lecture
- D. Au niveau du codon d'initiation de la traduction
- E. D'une délétion de la région terminale du gène

QCM 6

Parmi les propositions suivantes, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s) :

- A. La délétion complète d'un gène peut être la conséquence d'une recombinaison entre des séquences flanquantes homologues lors de la méiose
- B. La délétion d'une courte séquence répétée en tandem peut résulter d'un dérapage de la polymérase lors de la répllication de l'ADN
- C. La délétion d'une région chromosomique peut être à l'origine d'un phénotype de « gènes contigus »
- D. Les délétions de quelques nucléotides siégeant dans les gènes sont toujours délétères
- E. Une maladie due à la délétion d'un gène soumis à empreinte maternelle ne s'observe que lorsque l'allèle délétère est transmis par la mère

QCM 7

Parmi les propositions suivantes concernant les maladies par expansion de triplets, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s) :

- A. Elles intéressent les polymorphismes de type SNP
- B. Elles sont caractérisées par le phénomène d'anticipation
- C. Elles peuvent être associées à des pertes de fonction
- D. Elles peuvent être associées à des gains de fonction
- E. Les expansions de triplets sont localisées exclusivement dans les exons non codants

QCM 8

Parmi les propositions suivantes concernant la méthylation des promoteurs des gènes, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s) :

- A. Elle concerne la cytosine des dimères CpT
- B. Elle est associée à une extinction transcriptionnelle des gènes concernés
- C. Elle n'est observée qu'au niveau des promoteurs des gènes soumis à empreinte parentale
- D. Il s'agit d'une modification épigénétique
- E. Elle est identique dans tous les tissus de l'organisme quel que soit le stade de développement

QCS 1

Parmi les propositions concernant les mutations responsables de la perte de fonction d'un gène, indiquez celle qui est exacte :

- A. Elles sont retrouvées exclusivement dans les maladies héréditaires transmises sur un mode récessif

- B. Elles sont retrouvées exclusivement dans les maladies héréditaires transmises sur un mode dominant
- C. Elles sont toujours *de novo*
- D. Elles correspondent le plus souvent à des mutations faux sens
- E. Elles induisent la perte totale ou partielle de la fonction de la protéine correspondante

QCS 2

Parmi les mécanismes suivants, lequel peut correspondre à une « mutation par gain de fonction » ?

- A. Délétion totale ou partielle d'un gène
- B. Mutation au sein du promoteur à l'origine de la diminution de l'expression du gène

- C. Insertion de deux nucléotides au sein d'un exon codant
- D. Mutation non-sens
- E. Mutation faux sens

QCS 3

Parmi les propositions suivantes, laquelle est juste ?

Une mutation par décalage du cadre de lecture peut résulter :

- A. D'une insertion de deux nucléotides dans un exon codant
- B. D'une délétion de trois nucléotides dans un exon codant
- C. D'une insertion de dix nucléotides dans un promoteur
- D. D'une transition
- E. D'une mutation non-sens

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 9.1

Mécanisme d'apparition des transitions au sein du dimère CpG.

**e-figure 9.2**

Crossing-over inégaux entre chromosomes homologues.

Sur ce schéma, les chromosomes homologues sont repérés par la couleur de leur centromère. Le gène (rectangle blanc) est flanqué de séquences répétées directes (en gris). La recombinaison inégale (NAHR, pour *non-allelic homologous recombination*) entre deux chromosomes homologues peut conduire à la délétion ou la duplication du gène.

**e-figure 9.3**

Recombinaison inégale entre chromatides sœurs.

Le gène (rectangle blanc) est flanqué de séquences répétées directes (en gris). La recombinaison inégale entre chromatides sœurs peut conduire à la délétion ou la duplication du gène.

**e-figure 9.4**

Recombinaison intrachromatidienne : exemple du gène F8.

Le gène *F8* est schématisé par un rectangle blanc. Seuls les exons 1, 22, 23 et 24 sont représentés (rectangles noirs). Les séquences paralogues A sont répétées en aval du versant télomérique du gène *F8*. Une troisième séquence A orientée en antisens par rapport aux deux autres est présente au sein de l'intron 22. La recombinaison entre deux séquences A, l'une télomérique et la seconde dans l'intron 22 est à l'origine de l'inversion récurrente partielle du gène conduisant à la perte de sa fonction. Cette mutation récurrente du gène *F8* codant le facteur VIII de la coagulation rend compte de près de la moitié de cas d'hémophilies A sévères.



Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène

Éric Pasmant, Béatrice Parfait, Dominique Vidaud, Michel Vidaud

PLAN DU CHAPITRE

Techniques d'analyse des acides nucléiques : les outils de base

118

Application à l'analyse moléculaire : l'identification des mutations

126



Prérequis

Ces trente dernières années, les progrès de la biologie moléculaire et du génie génétique ont rendu possible l'analyse moléculaire des gènes par l'étude de l'ADN et/ou du produit de leur expression, l'ARN. Cette avancée technologique remarquable a abouti à la mise au point d'un nombre considérable de méthodes de diagnostic applicables aux maladies génétiques.

Dans le domaine de l'analyse moléculaire, l'année 1985 marque un tournant décisif avec l'invention d'une nouvelle technique qui allait révolutionner à la fois le quotidien des biologistes moléculaires et leur façon de penser. Cette découverte valut à son auteur, Kary Mullis, le prix Nobel de chimie en 1993. Appelée en anglais *polymerase chain reaction* (PCR), cette technique, qui réalise un véritable clonage *in vitro*, permet l'amplification spécifique d'une séquence nucléotidique.

Cette technologie se développe actuellement au travers de trousse commerciales disponibles pour le diagnostic de maladies héréditaires. Ces approches permettent entre autres le diagnostic de maladies héréditaires sur des prélèvements de très faible volume (cellules amniotiques ou trophoblastiques), la détection de cellules malignes, l'établissement de cartes d'identité génétique à partir de quelques racines de cheveux (médecine légale), etc. Le début du XXI^e siècle est marqué par l'avènement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (ou NGS, pour *next-generation sequencing*) qui vont permettre de réduire le coût et surtout le temps nécessaire pour le séquençage, en se basant sur la miniaturisation et le groupage parallèle des réactions dans des volumes très restreints.



L'essentiel à retenir

Les techniques de biologie moléculaire ont connu ces dernières années un essor considérable. Un nombre important de nouvelles méthodes a été développé. Les méthodes historiques telles que le Southern blot sont maintenant limitées à de rares applications spécifiques.

La mise en évidence d'anomalies moléculaires ponctuelles ou de quelques nucléotides est systématiquement réalisée après une réaction d'ampli-

fication par PCR. Les méthodes sont variées et le séquençage par méthode de Sanger reste une référence pour la détection de ces anomalies qualitatives. Les applications de la PCR en temps réel ont plus récemment permis de réels progrès dans le criblage des mutations (PCR spécifique d'allèle, HRM). Des techniques quantitatives ciblées (Q-PCR, MLPA, QMPSF) ou globales (CGH-array) ont également vu le jour et ont simplifié la mise en évidence des grands réarrangements (délétion d'un ou plusieurs exons, voire d'un gène entier). De nombreuses trousse commerciales sont disponibles et les délais d'analyse ont été grandement réduits.

Le séquençage haut débit de type NGS révolutionne actuellement la technique de séquençage. Ses applications diagnostiques permettent un saut technologique avec un changement d'échelle nécessitant un accompagnement bio-informatique pour l'analyse et l'interprétation des données générées.

Techniques d'analyse des acides nucléiques : les outils de base

Extraction des acides nucléiques

Un grand nombre de méthodes sont utilisées pour effectuer l'extraction des acides nucléiques. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques va dépendre du type cellulaire utilisé (cellules de mammifères, eucaryotes inférieurs, plantes, bactéries, virus, etc.), du matériel de départ (organe entier, tissu, culture cellulaire, sang, etc.), du résultat escompté (pureté, temps de préparation, quantité attendue, etc.) et des applications envisagées (PCR, RT-PCR, *Southern blot*, CGH-array, etc.).

L'étude de l'ADN est menée à partir de tout tissu disponible, frais ou congelé, y compris à partir de taches de sang séché après recueil sur papier (« carte de Guthrie »), de frot-tis buccaux, de cheveux mais également de prélèvement de placenta, de cellules en culture, etc. Habituellement, l'ADN est extrait à partir des leucocytes du sang circulant recueilli sur anticoagulant (EDTA si possible).

L'ARN peut être recueilli à partir de cellules en culture, de tissus fraîchement isolés ou conservés par congélation à -80°C ou dans l'azote liquide. Il est indispensable de prendre les précautions nécessaires pour inhiber toute action de RNases, enzymes ubiquitaires difficiles à inactiver. Dans la mesure du possible, la manipulation s'effectue à l'aide de vaisselle propre stérile ou à l'aide de matériel commercialisé *RNase free*, à l'aide de gants et dans la glace.

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'extraire les acides nucléiques : extraction phénol/chloroforme, extraction saline, colonnes d'affinité composées de silice, lysat leucocytaires. La qualité de l'extraction est en général appréciée par l'absence de protéines, de lipides et d'autres constituants cellulaires qui pourraient interférer avec les enzymes de restriction, les ligases ou les ADN polymérases...

La méthode de référence pour l'extraction des acides nucléiques emploie le phénol/chloroforme. Dans un premier temps les cellules sont lysées en présence d'un détergent tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS, pour *sodium dodecyl sulfate*). Pour l'extraction de l'ADN, une déprotéinisation est réalisée par utilisation de la protéinase K dans le tampon de lyse. Cette enzyme est active en présence de SDS et reste fonctionnelle à température élevée (56 à 65 °C). Sous ces conditions dénaturantes, les protéines sont mieux digérées par la protéinase K. D'autre part, la combinaison protéinase K/détergent/température élevée est importante pour l'inactivation des nucléases endogènes. Pour l'extraction de l'ARN, l'utilisation de sels chaotropiques (isothiocyanate de guanidinium, trifluoroacétate de guanidinium, urée), inhibiteurs de RNases, est indispensable.

L'extraction de phase en présence de phénol et de chloroforme permet de purifier les acides nucléiques et de récupérer, en fonction du pH de la phase organique, l'ADN ou l'ARN dans la phase aqueuse. Les acides nucléiques sont ensuite précipités en présence d'alcool (éthanol, isopropanol). Le précipité est ensuite repris dans de l'eau stérile.

L'ADN purifié se conserve bien à 4 °C. Les successions de congélation-décongélation peuvent entraîner une dégradation de l'ADN et doivent être évitées. L'ARN est conservé à -80 °C. Le stockage à long terme de l'ARN peut nécessiter l'addition d'un inhibiteur de RNase.

Le dosage d'une solution homogène d'acides nucléiques est réalisé par spectrophotométrie à 260 nm. La mesure de l'absorbance à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines. La pureté de la solution est estimée par le rapport des absorbances A_{260}/A_{280} (un ratio de 1,6 à 1,8 pour l'ADN et 1,8 à 2 pour l'ARN correspond à une contamination protéique minimale).

La qualité de l'extraction des acides nucléiques est également évaluée par électrophorèse en gel d'agarose. Après coloration par le bromure d'éthidium (BET), une bande de haut poids moléculaire est observée pour l'ADN. Pour l'ARN, doivent être observées deux bandes correspondant à la présence d'ARNr 28S et 18S (l'absence de haut poids moléculaire signe l'absence de contamination par l'ADN).

Les enzymes de restriction

Il s'agit d'endonucléases de restriction d'origine bactérienne. Ces enzymes coupent l'ADN double brin par clivage de deux fonctions phosphodiester au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques. Ces sites de restriction correspondent le plus souvent à des palindromes, la séquence étant identique sur les deux brins lorsqu'elle est lue dans le sens 5'→3'.

Les enzymes de restriction peuvent générer deux types de coupure : les coupures à bouts francs (*blunt ends*), l'enzyme coupe au même niveau sur les deux brins d'ADN ou les coupures à bouts collants (*cohesive ends*) décalés l'un par rapport à l'autre sur les deux brins. Certaines enzymes sont sensibles aux méthylations observées au niveau de certaines cytosines précédant une guanine (dimères CpG).

Les polymérases

ADN polymérases ADN dépendantes

Ces enzymes catalysent la formation d'une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ADN monobrin et de l'extrémité 3'OH libre d'un oligonucléotide (ou amorce) d'environ 20 nucléotides en présence de magnésium (Mg^{2+}) et de dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates : dATP, dGTP, dCTP et dTTP).

Une ADN polymérase peut catalyser trois types de réactions enzymatiques :

- activité ADN polymérase nécessitant une matrice ADN copiée par extension d'une amorce possédant une extrémité 3'OH libre;
- activité exonucléase 3'→5' de relecture (*proofreading*) ayant pour but d'éliminer toute base incorporée par erreur dans le brin d'ADN en cours de synthèse;
- activité exonucléase 5'→3' ayant pour but d'éliminer les nucléotides fragments appariés rencontrés lors de la polymérisation, c'est-à-dire dans le sens 5'→3'.

Plusieurs ADN polymérases sont utilisées en biologie moléculaire selon les activités enzymatiques que l'on souhaite mettre à profit :

- l'ADN polymérase I d'*Escherichia coli* présente les trois activités enzymatiques. En revanche le fragment de Klenow, issu de sa protéolyse limitée, a perdu l'activité exonucléase 5'→3'. L'introduction de deux mutations au sein de la séquence codant le fragment de Klenow a permis d'obtenir une enzyme dépourvue d'activité exonucléasique employée pour le marquage de sondes (*random priming*);

- les T4 et T7 ADN polymérases isolées à partir des phages T4 et T7 présentent des activités polymérasiques et 3'→5' exonucléasiques et permettent d'effectuer le marquage d'ADN en 3', la mutagénèse dirigée...
- la *Taq* polymérase a été purifiée à partir de *Thermus aquaticus*, bactérie se développant dans les sources chaudes (80 °C). Il s'agit d'une ADN polymérase ADN dépendante présentant une activité exonucléase 5'→3' mais dépourvue d'activité de relecture correctrice. Sa remarquable propriété de thermorésistance est la base de son utilisation en PCR;
- un certain nombre d'ADN polymérases thermostables ont été extraites d'autres bactéries thermophiles, chacune ayant une particularité la destinant à un usage particulier. Tli (*Thermococcus litoralis*) et Pwo (*Pyrococcus woesei*) présente une activité 3'→5' exonucléasique, la Tth ADN polymérase (*Thermus thermophilus*) présente également une activité de transcriptase inverse. Des enzymes dérivant de la *Taq* polymérase sont également commercialisées : l'AmpliTa[®] Gold est inactive à température ambiante, ce qui évite ainsi les extensions d'amorces hybridées de manière aspécifique.

ADN polymérases ARN dépendantes : transcriptases inverses

Les transcriptases inverses sont codées par le gène *pol* de différents rétrovirus.

Elles permettent la synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice constituée d'ARNm. Comme toutes les polymérases, une transcriptase inverse fonctionne dans le sens 5' → 3' à partir de l'extrémité OH libre d'une amorce sur laquelle vient se fixer un désoxyribonucléotide par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester. Différents types d'amorces peuvent être utilisés : oligo-dT s'hybridant sur la queue polyA des ARNm, *random hexamers* (combinaisons aléatoires de six nucléotides) s'hybridant à différents niveaux des ARNm ou oligonucléotides spécifiques de l'ARNm à étudier.

L'électrophorèse

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques chargées pouvant migrer dans un champ électrique. L'électrophorèse permet de séparer les fragments d'ADN ou les molécules d'ARN en fonction de leurs poids moléculaires, donc du nombre de bases ou de paires de bases, avec des degrés de résolution variables en fonction de la nature et de la densité de réticulation du gel utilisé. Deux types de gels sont utilisés : les gels d'agarose et les gels de polyacrylamide. En fonction de la taille du produit à examiner, la concentra-

tion d'agarose ou d'acrylamide à utiliser sera différente. Le gel de polyacrylamide est utilisé pour la séparation des petits fragments d'ADN d'une à plusieurs centaines de paires de bases (pb). Ses applications majeures sont la séparation des petits fragments d'ADN ou de produit d'amplification par PCR, le séquençage (gels dénaturants) et la purification d'oligonucléotides de synthèse. Les gels d'agarose sont utilisés à des concentrations comprises entre 0,6 et 2 %, ce qui permet la séparation de fragments d'acides nucléiques d'une taille allant jusqu'à 20 kb (produits de PCR, fragments d'ADN, molécules d'ARN). La visualisation des acides nucléiques s'effectue par addition d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET). Molécule spontanément non fluorescente, le BET intercalé entre les bases des acides nucléiques présente après illumination à 300 nm (UV) une fluorescence orange. Cette molécule est incorporée au gel de migration avant ou après migration et le gel peut être photographié.

La migration des acides nucléiques est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases du fragment. Plus le fragment est petit, plus il migre rapidement. En parallèle des fragments étudiés, l'électrophorèse d'un marqueur de poids moléculaires contenant des fragments de tailles connues est effectuée, ce qui permet de vérifier la taille d'un fragment de PCR (figure 10.1).

Le Southern blot

Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1975 par Edwin Southern. Le *Southern blot* permet l'étude d'un fragment d'ADN particulier au sein du génome après transfert des fragments d'ADN d'un gel d'électrophorèse sur une membrane. Les fragments d'ADN sont ainsi immobilisés et peuvent ensuite être étudiés. Dans un premier temps, l'ADN génomique double brin de haut poids moléculaire est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les fragments de différentes tailles sont alors séparés par électrophorèse en gel d'agarose. De nombreux fragments étant présents, la visualisation du gel sous UV après addition de bromure d'éthidium donne un aspect de frottis (*smear*). Cet aspect permet de s'assurer d'une bonne digestion de l'ADN. Le gel d'agarose est soumis à un traitement alcalin pour dénaturer les fragments d'ADN double brin en ADN simple brin. L'ADN est ensuite transféré (*blotting*) par un phénomène de capillarité sur un support solide (membrane de nitrocellulose ou de Nylon). La membrane subit alors un premier traitement, la préhybridation, afin de saturer les sites de fixation non spécifiques de la sonde sur la membrane.

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde marquée (radioactive ou froide) est ajoutée et s'hybride de manière spéci-

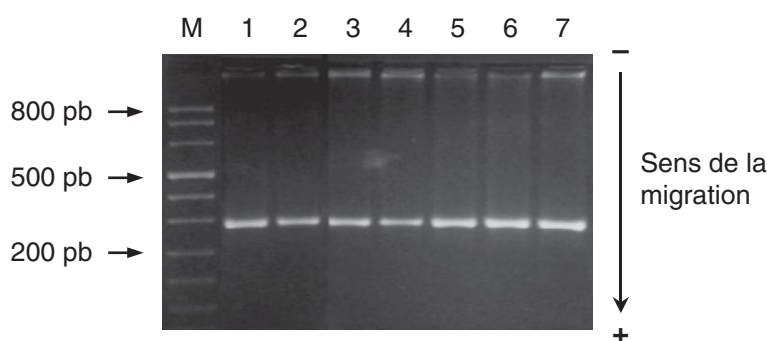


Figure 10.1

Vérification de la qualité de produits d'amplification par PCR de 295 pb (colonnes 1 à 7).

Le produit de PCR a été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 2 % suivi d'une coloration par le bromure d'éthidium. La migration est étalonnée avec un marqueur de poids moléculaire (colonne M) composé de fragments de tailles connues, ce qui permet de déterminer la taille du produit de PCR. M : marqueur de taille.

fique sur la séquence complémentaire. Une étape de lavage est nécessaire afin d'éliminer des fixations non spécifiques de la sonde. Ces lavages se font en solutions plus ou moins stringentes (les solutions riches en sels sont peu stringentes et les solutions pauvres en sels sont stringentes). Une solution stringente déstabilise les séquences appariées.

La révélation du signal dépend ensuite du type de marqueur de sonde utilisé (autoradiographie, chimiluminescence...). Une sonde est une séquence nucléotidique homologue à une séquence (ici d'ADN) avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre bases complémentaires. La sonde est au préalable marquée afin de pouvoir visualiser le fragment d'ADN génomique (ou d'ARN) correspondant. Il existe des sondes radioactives (marquées le plus souvent avec l'isotope radioactif P^{32}) ou « froides » (système avidine-biotine, digoxigénine marquée par un fluorophore ou couplée à une révélation chimiluminescente).

Cette technique semi-quantitative permet par exemple de mettre en évidence des remaniements de l'ADN (délétions, insertions de plus de 150–300 pb, inversions) ou d'effectuer des cartographies de restriction.

Le Northern blot

Cette technique dérivée du *Southern blot* est adaptée à l'analyse d'un ARN particulier au sein d'ARN totaux. Au cours d'un *Northern blot*, les ARN totaux d'un tissu sont séparés selon leurs tailles par électrophorèse dans un gel d'agarose dénaturant suivi d'un transfert sur une membrane inerte. Les ARN totaux ne sont pas digérés avant électrophorèse, leur taille étant compatible avec une migration dans l'agarose. D'autre part, l'électrophorèse est réalisée en milieu dénaturant (formaldéhyde) pour éli-

miner les liaisons hydrogène éventuelles entre molécules ou au sein des molécules d'ARN. L'utilisation d'une sonde moléculaire spécifique complémentaire de l'ARN recherché permet de révéler, après autoradiographie de la membrane, une ou plusieurs bandes dans le cas de transcrits multiples. Cette technique semi-quantitative permet de mettre en évidence l'absence ou la diminution d'un ARNm (réarrangements majeurs, mutation du promoteur, anomalie de la transcription ou transcrit instable), d'en déterminer la taille normale ou anormale (en cas de mutation d'épissage ou de délétions, par exemple) ou d'identifier des transcrits alternatifs.

PCR, RT-PCR

La technique de polymérisation en chaîne (PCR, pour *polymerase chain reaction*) consiste en une amplification *in vitro* d'une courte séquence d'ADN située entre deux oligonucléotides de synthèse (encore appelés amorces ou *primers*) grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable : la *Taq* polymérase. Il s'agit d'une technique majeure de biologie moléculaire permettant l'obtention d'une grande quantité de matériel nucléaire (amplicons) à partir d'une séquence d'ARN ou d'ADN en quantités infimes.

L'ensemble de la réaction d'amplification est constitué d'une succession d'une trentaine de cycles eux-mêmes constitués de trois étapes :

- une *étape de dénaturation* par la chaleur de l'ADN double brin afin de générer de l'ADN simple brin. Le mélange réactionnel est chauffé à 94 °C pendant environ 1 minute;
- une *étape d'hybridation* des amorces complémentaires des séquences encadrant la région à amplifier, chacune se fixant à un brin d'ADN, dans des orientations opposées. En

condition de renaturation (autour de 55 °C) l'hybridation immédiate et spécifique des oligonucléotides avec leurs séquences complémentaires s'effectue. Ces oligonucléotides sont présents à des molarités au moins 10 fois supérieures à celle de leurs séquences cibles;

- une étape de polymérisation au cours de laquelle les brins matrices sont recopiés à partir de chacune des deux amorces par une ADN polymérase ADN dépendante, la *Taq* polymérase en présence de Mg^{2+} et des quatre dNTP (dTTP, dATP, dGTP et dCTP). La *Taq* polymérase, extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, présente la particularité d'être thermostable, de pouvoir fonctionner à haute température (72 °C) et de supporter le chauffage à 95 °C.

Ce premier cycle permet de doubler le nombre des séquences cibles. Après cette élongation, un nouveau cycle est réalisé. Le mélange est chauffé à 94 °C pour dénaturer à nouveau l'ADN, puis replacé dans des conditions d'hybridation. Les oligonucléotides vont à nouveau s'hybrider à leurs séquences complémentaires et l'ADN polymérase va recopier l'ensemble des matrices à partir des amorces, dupliquant ainsi les deux séquences obtenues par l'étape précédente (figure 10.2).

Après ces deux premiers cycles, la séquence recherchée, encadrée par les deux oligonucléotides, aura été synthétisée en quatre exemplaires. Après n cycles, la quantité de séquence cible sera théoriquement multipliée par 2^n . Cette valeur est cependant purement théorique et correspond à un rendement idéal de 100 % pour chaque réaction. En réalité, l'ADN de départ est amplifié de façon exponentielle selon la formule : $N_f = N_0 (1 + \epsilon)^n$ avec N_f : nombre de molécules formées, N_0 : nombre de molécules initiales, ϵ : rendement de la réaction, n : nombre de cycles.

Ce processus est aisément automatisable et de nombreuses machines (appelées *thermocycler*) effectuent les cycles de dénaturation/élongation en continu (variations de température). L'utilisation d'une ADN polymérase thermostable (*Taq* polymérase) permet d'effectuer les amplifications en chaîne, sans que l'enzyme soit dénaturée par les hautes températures atteintes lors de l'étape de dénaturation. Les élongations à température élevée augmentent également le rendement de la réaction en supprimant la majorité des structures secondaires de l'ADN, réduisant ainsi d'autant les risques d'arrêt prématuré de l'ADN polymérase.

Il est également possible d'amplifier des séquences d'ARN en faisant précéder la réaction d'amplification proprement dite par une réaction de transcription inverse

qui transforme l'ARN en ADNc (pour ADN complémentaire) simple brin qui sera recopié au cours du premier cycle d'amplification (cf. *supra* : transcriptase inverse). La RT-PCR (pour *reverse transcription PCR*) permet ainsi, à titre d'exemple, la mise en évidence de transcrits anormaux liés à des mutations d'épissage.

Une fois les réactions d'amplification effectuées, il est nécessaire dans un premier temps de vérifier la qualité du produit obtenu ce qui est facilement réalisable par électrophorèse en gel d'acrylamide ou d'agarose et coloration par le bromure d'éthidium.

La PCR en temps réel : application de la PCR à l'analyse quantitative

Le développement de la PCR a également révolutionné le domaine de la quantification des acides nucléiques. La PCR quantitative repose sur l'exploitation de la cinétique de la réaction. La PCR en temps réel est réalisée grâce à un appareillage permettant de suivre en continu l'apparition des produits d'amplification grâce à l'émission d'une quantité de fluorescence proportionnelle à la quantité de produits formés, qui est elle-même dépendante de la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon à analyser.

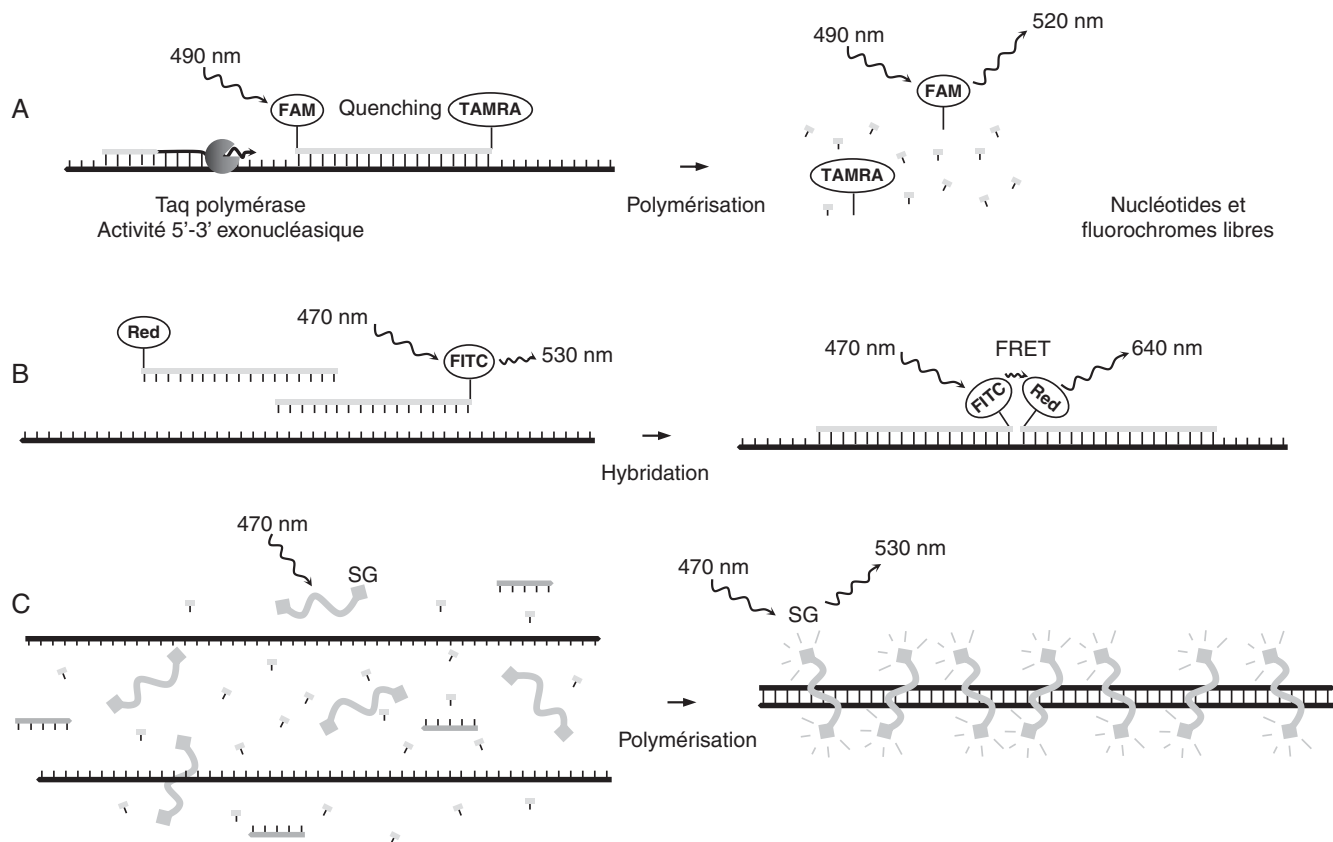
Plusieurs chimies peuvent être utilisées pour générer un niveau de fluorescence détectable (e-figure 10.3) :

- le FRET (pour *fluorescence resonance energy transfer*) mis à profit dans l'utilisation de sondes d'hydrolyse (TaqMan®) et de sondes d'hybridation;
- l'incorporation de SYBR® Green, agent intercalant de l'ADN double brin émettant à 530 nm.

Dans la PCR en temps réel, l'émission de fluorescence est enregistrée à chaque cycle ce qui permet de tracer une courbe reflétant la cinétique de la réaction et de déterminer le cycle pour lequel l'émission de fluorescence est supérieure au seuil de détection de l'appareil, c'est-à-dire devient supérieure au bruit de fond (Cp ou Ct pour cycle seuil ou *threshold cycle*). Ce cycle se situe dans la phase exponentielle de la PCR où la relation $N_f = N_0 (1 + \epsilon)^n$ est respectée. La précocité de ce cycle est donc directement proportionnelle à la quantité de cible présente dans l'échantillon à quantifier. Il est donc possible d'établir une droite d'étalonnage à l'aide de solutions de concentrations connues et de doser ainsi une solution de concentration inconnue.

Conçue initialement pour la quantification, cette technologie s'applique également à l'analyse qualitative





e-figure 10.3

Représentation des différents types de fluorescence utilisés pour la PCR en temps réel.

A : chimie TaqMan®. Cette technologie met à profit l'activité 5' → 3' exonucléasique de la *Taq* polymérase. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde doublement marquée est non fluorescente en raison de l'extinction (*quenching*) de la fluorescence du fluorophore rapporteur FAM par le fluorophore quencher TAMRA situé à proximité. Lors de l'étape de polymérisation, la sonde est dégradée par la *Taq* polymérase (activité 5' → 3' exonucléasique). Le fluorophore rapporteur libre émet alors un signal après excitation (perte du *quenching*). Ce signal de fluorescence est enregistré à la fin de l'étape de polymérisation.

B : sondes d'hybridation. Lors de l'étape d'hybridation, les deux sondes se fixent sur le même brin matrice et sont séparées par une à trois pb. Après excitation, le fluorophore (FITC) en 3' de la première sonde émet une quantité d'énergie capable d'exciter le fluorophore (Red 640) en 5' de la deuxième sonde (*fluorescence resonance energy transfer* [FRET]). L'émission du signal à 640 nm est enregistrée à la fin de l'étape d'hybridation.

C : utilisation du SYBR® Green (SG). En présence d'ADN double brin, le SYBR® Green s'intercale au niveau des sillons d'ADN. Il émet alors une fluorescence à 530 nm après excitation à 470 nm. L'enregistrement de la fluorescence s'effectue après polymérisation.

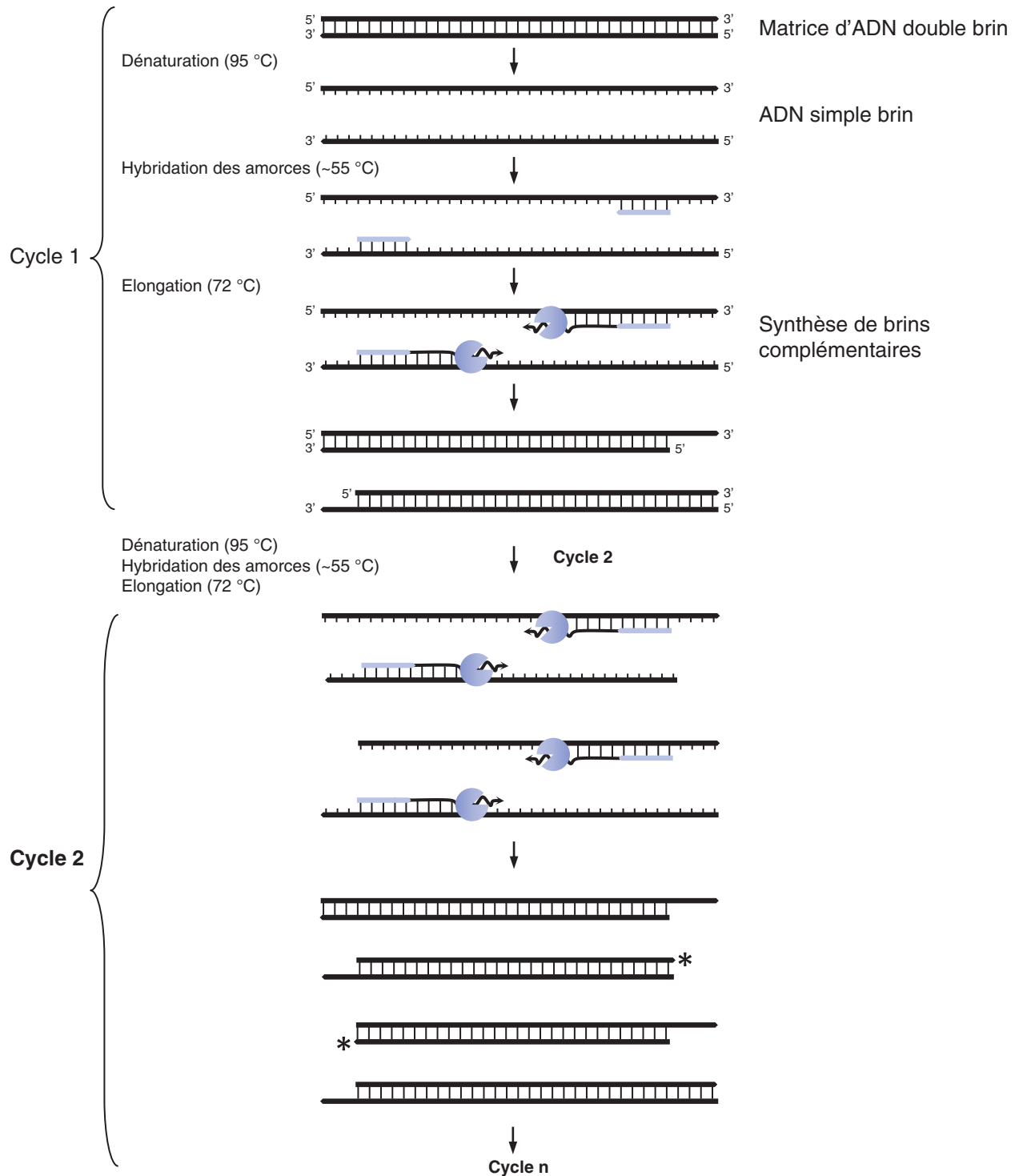


Figure 10.2

Représentation des deux premiers cycles d'une PCR.

Au dixième cycle, 98 % des molécules présentent une taille identique (*), déterminée par la position des oligonucléotides. L'automatisation permet l'enchaînement de plus de 30 cycles en moins de trois heures. L'ADN de départ est amplifié de façon exponentielle selon la formule : $N_f = N_0 (1 + \varepsilon)^n$ avec N_f : nombre de molécules formées, N_0 : nombre de molécules initiales, ε : rendement de la réaction, n : nombre de cycles.

des acides nucléiques grâce à l'utilisation de sondes ou d'amorces spécifiques de fragments d'ADN sauvages ou mutés.

Séquençage par méthode de Sanger

Actuellement, l'essentiel du séquençage de l'ADN est réalisé grâce à la technique enzymatique rapportée par Frederick Sanger en 1977. La matrice d'ADN permettant le séquençage est un ADN simple brin généré par dénaturation d'un produit PCR ou par clonage dans un vecteur d'un fragment d'ADN génomique ou d'ADNc. La *Taq* polymérase réalise la synthèse d'un nouveau brin d'ADN, complémentaire de la matrice à partir de l'extrémité 3'OH libre d'un oligonucléotide, de dNTP, de didésoxyribonucléotides (ddNTP) identiques aux dNTP normaux à l'exception de groupement hydroxyle en position C3' du désoxyribose. Les ddNTP sont incorporés dans la chaîne d'ADN en croissance en formant une liaison phosphodiester entre leur C5' et le C3' du nucléotide précédemment incorporé. Le ddNTP incorporé dépourvu d'hydroxyle en C3' entraîne un arrêt de la synthèse de la chaîne.

La réaction de séquençage est effectuée en utilisant une concentration en ddNTP nettement inférieure à celle de son analogue normal dNTP et la terminaison de chaîne survient au hasard au niveau de toutes les positions contenant la base en question. À la fin de la réaction, une collection de fragments d'ADN de tailles différentes est obtenue avec une extrémité 5' commune (l'oligonucléotide) et une extrémité 3' variable se terminant par un ddNTP. Les fragments qui diffèrent en taille, même par un seul nucléotide, peuvent être séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (figure 10.4).

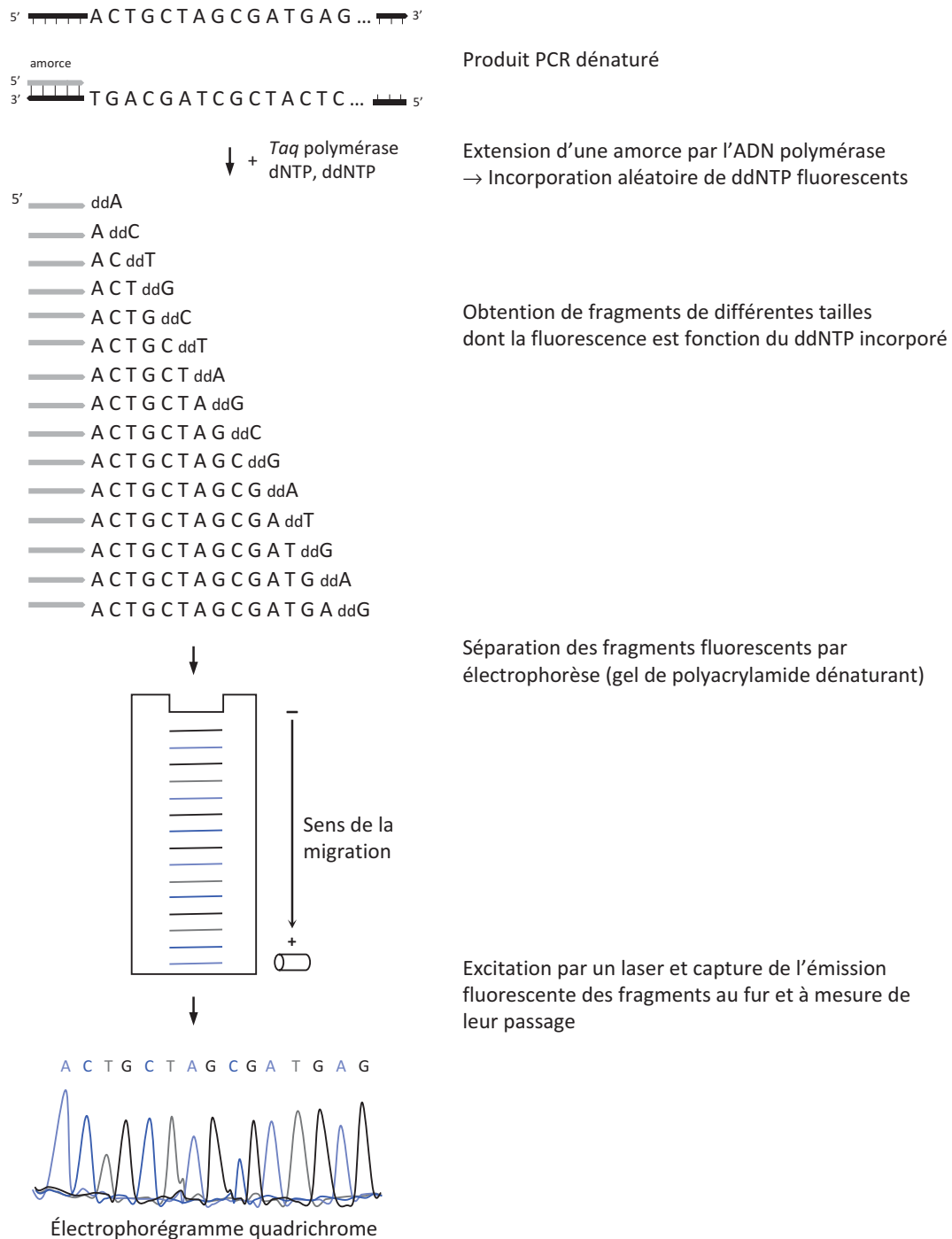
Les fragments de tailles différentes peuvent être détectés en utilisant des ddNTP marqués ou des oligonucléotides marqués. Une amélioration majeure du séquençage par méthode de Sanger a été le développement de techniques automatisées permettant le séquençage fluorescent de l'ADN. Ces techniques utilisent des amorces ou des ddNTP auxquels sont couplées des molécules fluorescentes. Le marquage des 4 ddNTP par 4 fluorophores différents permet de réaliser le séquençage en une seule réaction. Les fragments d'extension sont donc marqués en 3' par incorporation de ddNTP fluorescents (*dye terminators*). Les fragments d'extension sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En cours d'électrophorèse, des données brutes sont générées dans l'appareil de séquençage semi-automatique par

la détection en temps réel des fragments fluorescents résultant de la réaction de séquençage après excitation des fluorophores par un laser bichromatique. Les signaux de fluorescence sont ensuite digitalisés puis transmis à une unité informatique qui permet l'enregistrement, le traitement et enfin le stockage des données brutes. Après traitement, les données de la séquence sont visualisées ou imprimées sous forme d'électrophorégramme (figure 10.4).

Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une méthode récente de séquençage par synthèse, qui se caractérise par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (*real time sequencing*) qui ajoute un seul nucléotide non fluorescent à la fois. Contrairement à la technique de séquençage de type Sanger, les nucléotides sont ajoutés l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et libère un pyrophosphate. Ce pyrophosphate (PPi) est alors transformé par l'ATP sulfurylase en ATP qui est utilisé par une luciférase. On a alors production d'oxyluciférine et d'un signal lumineux analysé par un capteur et reproduit sous forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur du pic est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence à partir de la taille des pics obtenus. Le pyroséquençage est particulièrement employé pour l'analyse de la méthylation de l'ADN (position 5' d'une cytosine appartenant à un dinucléotide de type CpG) après traitement au bisulfite de sodium. Le bisulfite de sodium permet de transformer les cytosines en uraciles sans altérer les cytosines méthylées. L'analyse différentielle d'un ADN préalablement traité ou non au bisulfite de sodium permet de déduire les cytosines méthylées.

Le pyroséquençage s'inscrit dans les nouvelles technologies de séquençage qui ont récemment vu le jour. Le séquençage de type NGS (*next-generation sequencing*) permet le séquençage des acides nucléiques à haut débit. On estime que 10 années sont nécessaires pour séquencer un génome complet par technologie Sanger. Ce délai passe à quelques jours avec les machines à très haut débit actuelles. Les techniques de NGS se caractérisent par l'utilisation d'approches massivement parallèles, permettant de séquencer des centaines de milliers de fragments simultanément. Les principes de ces nou-

**Figure 10.4**

Principe du séquençage de l'ADN utilisant les ddNTP fluorescents, selon la méthode de Sanger.

velles techniques de séquençage à haut débit et leurs applications en diagnostic sont détaillées dans le [chapitre 11](#) (« Le séquençage de nouvelle génération ») du présent ouvrage. Ces développements récents ont nécessité le développement d'outils bio-informatiques adaptés

permettant l'alignement des séquences et la détection et l'aide à l'interprétation des variants. Le [chapitre 24](#) (« Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique ») présente ces aspects de la bio-informatique appliquée au séquençage à haut débit.

Application à l'analyse moléculaire : l'identification des mutations

Depuis l'avènement de la PCR, de nombreuses stratégies diagnostiques se sont développées dans le but d'identifier les mutations à l'origine de pathologies héréditaires. Ces stratégies diffèrent selon que le gène a été ou non identifié, et que la mutation en cause est connue ou non. La mise en évidence d'une altération génomique est de difficulté variable selon la nature du gène et le type d'altération. Dans tous les cas, pour explorer directement un gène il faut disposer d'une sonde clonée spécifique de ce gène ou en connaître la séquence normale (disponible dans les banques de données en ligne), soit pour synthétiser une oligosonde spécifique, soit pour amplifier par PCR le segment génomique où siège la lésion.

Méthodes d'identification des mutations ponctuelles

Détection de mutations inconnues

Séquençage

Le séquençage direct peut bien entendu être utilisé dans tous les cas de figure mais il se révèle particulièrement lourd pour des gènes de grande taille et des pathologies présentant une hétérogénéité génétique importante. Le développement récent du NGS trouve ici une application majeure (voir [chapitre 11, « Le séquençage de nouvelle génération »](#)). Outre le séquençage, la mise en évidence de mutations inconnues, surtout au sein de gènes de grande taille, utilise des techniques qui permettent de repérer l'emplacement de la mutation (*pré-screening*) afin de limiter l'étape ultime de séquençage qui identifie la mutation.

Méthodes de pré-screening

L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

La température de fusion d'un ADN (séparation des deux brins) est fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle modifiant cette séquence entraîne donc une modification de la température de fusion. Cette modification peut être mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient d'agents dénaturants de type urée ou formamide (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*). La séquence à analyser et la séquence de référence sont amplifiées par PCR. Les produits de la réaction sont

soumis à une électrophorèse de type DGGE et les distances de migration des fragments amplifiés sont comparées. Une différence de migration signe la présence d'une différence au sein de la séquence.

L'analyse du polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (SSCP)

Elle repose sur le principe suivant : lorsqu'un segment de DNA double brin (fragment PCR) est dénaturé par la chaleur puis refroidi brutalement, les brins restent séparés. Soumis alors à une électrophorèse non dénaturante, chaque brin se renature sur lui-même et prend une conformation spécifique dépendant de sa séquence nucléotidique et conditionnant sa migration électrophorétique (SSCP, pour *single-strand conformation polymorphism*). Une variation de séquence aussi minime qu'une mutation ponctuelle peut se manifester par une différence de conformation et donc de migration électrophorétique par rapport à une séquence de référence.

Chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC)

Après une étape de dénaturation-renaturation visant à former des hétéro- et homoduplexes en cas d'hétérozygotie de la séquence d'intérêt, les produits de PCR sont soumis à une chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC, pour *denaturing high performance liquid chromatography*) en phase inverse par formation de paires d'ions au sein d'une colonne contenant des particules alkylées non poreuses. Dans des conditions dénaturantes partielles (gradient linéaire d'acétonitrile), les hétéroduplexes formés par les produits de PCR contenant une variation de séquence présentent un temps de rétention plus faible au sein de la colonne que leurs homoduplexes correspondant. L'identification d'échantillons présentant un polymorphisme ou une mutation est réalisée grâce à l'analyse des profils d'élution. Pour rechercher un variant homozygote, l'ADN étudié est préalablement mélangé à un ADN contrôle afin d'obtenir des hétéroduplexes après l'étape de dénaturation-renaturation des produits PCR. Les avantages majeurs de cette technologie sont l'automatisation, la rapidité de l'analyse (moins de 5 min par échantillon) et la taille des fragments d'ADN analysables (jusqu'à 1500 pb).

Le clivage chimique des mésappariements

Après dénaturation des produits d'amplification et renaturation, l'utilisation de réactifs chimiques permet la reconnaissance et la modification spécifique des bases impliquées dans des mésappariements. L'hydroxylamine modifie les

cytosines et le tétraoxyde d'osmium les thymines. L'ADN est ensuite clivé au niveau des bases altérées et les produits de clivage sont analysés par électrophorèse.

High resolution melting curve analysis (HRM)

La technique HRM, de développement relativement récent, repose sur l'intégration à de l'ADN amplifié par PCR d'un fluorochrome intercalant. Les structures doubles brins sont saturées par le fluorochrome en fin de PCR et l'émission de fluorescence est alors maximale. L'augmentation de température programmée et progressive entraîne la fusion des brins d'ADN. Cette séparation des deux brins provoque le relargage du fluorochrome et induit donc une baisse de fluorescence, puis son extinction totale lorsque la dénaturation est complète. À une séquence d'ADN donnée correspond donc, pour une montée en température progressive standardisée, une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. Si la séquence d'ADN analysée comporte des variants, des mutations, de courtes insertions/délétions, la signature change révélant ainsi l'existence d'un autre profil de fusion. L'HRM permet la détection rapide de ces anomalies avec une sensibilité très élevée. En outre, la quantification des acides nucléiques étant possible avec cette méthode, on peut ainsi obtenir une information à la fois qualitative et quantitative (estimation des ratios alléliques). Elle est appliquée pour la détection et la quantification de mutations ponctuelles récurrentes notamment en oncologie et hématologie. Des kits commerciaux ont été développés pour la détection des mutations des gènes *KRAS*, *BRAF* ou *JAK2*, par exemple.

Les méthodes de SSCP, DGGE, dHPLC, clivage chimique des mésappariements, HRM sont capables de révéler une variation de séquence dans un produit de PCR. En cas de résultat positif, il faudra analyser la séquence pour positionner et identifier la mutation.

Détection de mutations connues

Modification de la carte de restriction : PCR-RFLP

Le diagnostic direct (identification de l'anomalie moléculaire en cause dans la pathologie) par modification de la carte de restriction (amplification/digestion par une enzyme de restriction) concerne les mutations qui abolissent un site de restriction préexistant ou qui créent un nouveau site (RFLP, pour *restriction fragment length polymorphism*). La probabilité d'une telle situation est relativement faible mais lorsque la coïncidence existe, elle facilite considérablement le diagnostic, puisqu'une simple digestion par l'enzyme suffit à fournir la réponse.

Cette méthodologie nécessitait autrefois la mise en œuvre d'un Southern blot ce qui pouvait prendre plusieurs jours. Actuellement, les digestions s'effectuent après amplification par PCR de la séquence d'intérêt. Une simple électrophorèse en agarose suivie d'une coloration par le bromure d'éthidium permet de visualiser directement la présence ou l'absence de coupure.

Grâce à la PCR, il est également possible de créer ou d'abolir artificiellement un site lorsque la mutation ne modifie pas naturellement la carte de restriction. À titre d'exemple, dans l'ACRS (*allele by amplification created restriction site*) un site de restriction est créé dans l'amplimère en utilisant une amorce modifiée positionnée juste avant le site susceptible d'être muté. Cette amorce a subi une modification de séquence telle qu'un site de restriction est créé dans l'amplimère normal et aboli dans l'amplimère muté ou inversement.

Techniques basées sur l'amplification et la spécificité de l'hybridation

Diagnostic direct par hybridation spécifique (ASO, pour *allele-specific oligoprobe*)

Le principe de la détection d'une mutation ponctuelle par oligosonde de synthèse (méthode dite « ASO ») emploie des oligosondes d'une vingtaine de nucléotides, internes par rapport aux amorces d'amplification et dont la séquence est complémentaire de l'allèle recherché. L'hybridation est réalisée après immobilisation sur filtre. La version normale de la sonde ne peut s'hybrider qu'avec l'allèle normal. Réciproquement, la version mutée de la sonde ne peut s'hybrider qu'avec l'allèle muté. Les hybridations croisées ne sont pas stables en raison de mauvais appariement (*mis-match*) entre bases non complémentaires.

PCR spécifique d'allèle

(ARMS, pour *amplification-refractory mutation system*)

Une autre approche consiste à amplifier spécifiquement l'allèle muté (ou sauvage) en utilisant des oligonucléotides s'hybridant de manière spécifique sur l'un des deux allèles.

Ligation d'oligonucléotide

(OLA, pour *oligonucleotide ligation assay*)

Deux types d'oligonucléotides de synthèse sont choisis pour correspondre lorsqu'ils sont placés bout à bout, à une séquence continue chevauchant la mutation recherchée. En l'absence de mutation, l'hybridation parfaite des deux oligonucléotides permet l'action d'une ligase. En présence de la mutation, l'hybride formé est imparfait et la ligase ne peut agir. La différence de taille des oligonucléotides ligués ou non est observée après électrophorèse.

Méthodes d'identification des grands réarrangements géniques

Southern blot

Les délétions, insertions de plus de 150–300 pb, duplications, inversions de grande taille sont en général faciles à mettre en évidence par la méthode de Southern blot.

Utilisation des microsatellites

La mise en évidence d'une délétion peut faire appel à l'étude des microsatellites. Ces marqueurs sont différents d'un individu à l'autre (polymorphes) et sont transmissibles à la descendance.

Les microsatellites sont un exemple extrême de la répétition en tandem où le motif de base est très court de 1 à 4 paires de bases. Le motif le plus fréquemment répété est la paire CA(n) ou GT(n). Il est rencontré en moyenne tous les 10 kb d'ADN génomique. Le nombre de répétitions ne dépasse pas une quarantaine et la limite inférieure des répétitions est autour d'une douzaine. La mise en évidence du polymorphisme d'un microsatellite se fait par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques situées dans les séquences uniques flanquantes.

L'amplification de microsatellites polymorphes génère généralement deux fragments PCR de taille différente, signant la présence de deux allèles distincts. La présence d'un seul produit d'amplification suggère donc une possible hémizygotie du locus étudié.

Dosage génique par PCR en temps réel

Lors de la PCR en temps réel, l'amplification du produit de PCR est suivie au cours du temps par son émission de fluorescence. Cette méthode (appelée également PCR quantitative en temps réel ou Q-PCR) permet de quantifier précisément le nombre de copies initiales d'ADN, de manière absolue (réalisation d'une courbe d'étalonnage) ou relative. Dans ce dernier cas, le Ct (*threshold cycle*) obtenu pour l'ADN du sujet étudié pour un produit PCR particulier est rapporté au Ct d'un gène contrôle normalement diploïde. Ce rapport de Ct chez le sujet étudié est alors comparé au rapport mesuré chez un sujet contrôle pour déterminer le nombre relatif de copies du gène étudié.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Cette méthode quantitative permet de faire un dosage génique de plusieurs cibles simultanément. La MLPA emploie

des couples de sondes de longueurs déterminées, qui lorsqu'elles sont hybridées à leurs séquences cibles adjacentes sur l'ADN génomique, peuvent être liées par une enzyme de type ADN ligase. Cela permet l'amplification de tous les sites ciblés au moyen d'une seule paire d'amorces fluorescentes qui s'avère complémentaire des deux extrémités libres que comptent toutes les sondes. Les produits d'amplification sont soumis à un système d'électrophorèse capillaire et séparés en fonction de leur taille, de façon à ce que chaque pic soit le produit d'amplification d'une sonde distincte. Les tailles des produits de PCR sont différentes d'une cible à l'autre, de façon à pouvoir les identifier. Au moyen d'une série de calculs de normalisation, le nombre de copies peut être déterminé pour chacune des séquences cibles. La MLPA peut permettre l'identification de délétions d'un ou plusieurs exons au sein des gènes ciblés. Cette technologie se développe actuellement au travers de trousse commerciales disponibles pour le diagnostic de maladies héréditaires.

Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF)

Le principe du test est d'amplifier par PCR, différents exons du gène à tester dans une même réaction (PCR « multiplexe »). La PCR est réalisée en conditions quantitatives, c'est-à-dire que le nombre de cycles est limité. Chaque exon est amplifié à l'aide d'un couple d'oligonucléotides dont un est marqué par un fluorochrome, de façon à détecter le produit de PCR par fluorescence sur un séquenceur automatique. Les tailles des produits de PCR sont différentes d'un exon à l'autre de façon à pouvoir les identifier. Les PCR de l'ADN du patient à tester et de l'ADN d'un individu témoin (non délété) sont réalisées simultanément. La superposition des signaux de fluorescence du témoin et du patient permet de détecter les délétions ou les duplications.

Hybridation *in situ* fluorescente (FISH, pour fluorescence *in situ* hybridization)

Des sondes nucléotidiques fluorescentes spécifiques des séquences à étudier sont mises en présence de chromosomes en métaphase ou interphase, fixés sur une lame. En cas de duplication de la séquence reconnue par la sonde, trois signaux de fluorescence sont détectés. En cas de délétion, un seul signal est visualisé. Une sonde contrôle est également présente et permet la visualisation de deux signaux de fluorescence. Le [chapitre 9 du présent ouvrage](#) (« Cytogénétique moléculaire ») détaille cette technique de cytogénétique moléculaire, ainsi que l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA ou CGH-array).

Comparative genomic hybridization array (CGH-array)

La CGH-array (hybridation comparative génomique sur puce à ADN) ou ACPA (analyse chromosomique sur puce à ADN) permet d'évaluer simultanément le nombre de copies d'ADN de milliers voire de millions de localisations chromosomiques dans des échantillons biologiques. L'hybridation simultanée et compétitive de deux ADN marqués avec deux fluorophores différents est réalisée sur des sondes déposées sur une lame. Les sondes, historiquement de type BAC (pour *bacterial artificial chromosome*) ou actuellement de type oligonucléotides déposés (*spot*)

sont représentatives de l'ensemble ou d'une fraction du génome. Le rapport pour chacun des dépôts entre les émissions de fluorescence des deux fluorochromes reflète la différence de nombre de copies des deux ADN cohybridés, et ce pour chacune des positions du génome testées (représentées par les sondes).

Bibliographie

Kaplan JC, Delpech M. Biologie moléculaire et médecine. 3^e éd. Flammarion Médecine/Science; 2007.
Strachan Tom, Goodship Judith, Chinnery Patrick. Genetics and genomics in medicine. 1^{re} éd. Garland Sci Publishers; 2014.

ENTRAÎNEMENT 10 QCM-QCS

QCM 1

Parmi les propositions suivantes concernant la réaction d'amplification en chaîne (*polymerase chain reaction* [PCR]), lesquelles sont justes ?

- A. Elle s'effectue en présence d'une ADN polymérase ADN dépendante thermostable
- B. Elle nécessite la présence d'amorces oligonucléotidiques présentant une extrémité 3'OH libre
- C. Elle nécessite la présence de Mg^{2+} , dATP, dGTP, dCTP et dTTP
- D. Elle peut s'effectuer sur l'ADN génomique
- E. Elle peut s'effectuer sur l'ARNm après transcription inverse, lorsque les amorces sont introniques

QCM 2

Parmi les propositions suivantes concernant la réaction d'amplification en chaîne (PCR), laquelle/lesquelles est/sont exacte(s) ?

- A. Permet de multiplier *in vitro* de manière exponentielle un fragment d'ADN génomique
- B. Permet de multiplier *in vitro* de manière exponentielle un fragment d'ADNc
- C. Les amorces sont incorporées au produit d'amplification
- D. Les amorces sont des oligonucléotides d'une vingtaine de nucléotides
- E. Le produit d'amplification accumulé possède une taille précise

QCM 3

Parmi les propositions suivantes, donner la (les) réponse(s) exacte(s). Le *Southern blot* :

- A. Vise à détecter la présence d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques dans le génome entier
- B. Permet de détecter la présence d'une mutation sur une séquence nucléotidique définie (RFLP, pour *restriction fragment length polymorphism*)
- C. Permet l'analyse des ARN messagers

D. Utilise le principe de l'hybridation moléculaire

E. Peut être utilisé pour la détection de grands réarrangements géniques

QCM 4

Donner la (les) réponse(s) exacte(s). La réalisation d'un *Southern blot* nécessite d'utiliser :

- A. Un gel d'électrophorèse
- B. Des enzymes de restriction
- C. Une ADN polymérase
- D. Des sondes nucléotidiques
- E. De l'ARNt

QCM 5

Parmi les techniques suivantes, laquelle/lesquelles permet/tent l'étude de l'ADN ?

- A. *Southern blot*
- B. PCR
- C. *Northern blot*
- D. Séquençage
- E. *Western blot*

QCM 6

Parmi les propositions suivantes concernant le séquençage des acides nucléiques par la méthode de Sanger, laquelle/lesquelles est/sont exacte(s) ?

- A. Utilise une amorce oligonucléotidique
- B. Utilise des désoxyribonucléotides triphosphates
- C. Utilise des didésoxyribonucléotides triphosphates
- D. Est applicable directement à l'ARN
- E. Utilise une ADN polymérase

QCM 7

Parmi les propositions suivantes concernant le séquençage des acides nucléiques par la méthode de Sanger, laquelle/lesquelles est/sont exacte(s) ?

- A. Il permet de mettre en évidence des substitutions nucléotidiques de type SNP
- B. Il permet de mettre en évidence des mutations dues à des transitions
- C. Il permet de mettre en évidence des mutations dues à des délétions ou insertions de quelques nucléotides
- D. Il permet la caractérisation de variations nucléotidiques au sein de la séquence d'un exon
- E. Il permet la caractérisation de variations nucléotidiques au sein de la séquence d'un intron

QCM 8

Parmi les propositions suivantes concernant le séquençage des acides nucléiques par la méthode de Sanger, laquelle/lesquelles est/sont exacte(s) ?

- A. Dans la majorité des cas, il est réalisé après amplification par PCR du segment d'ADN à étudier
- B. L'ADN à séquencer doit être sous forme double brin
- C. Les réactions de séquence sont des réactions de polymérisation de l'ADN
- D. Les produits issus d'une réaction de séquence diffèrent entre eux par leur taille
- E. L'extrémité 3' des produits issus d'une réaction de séquence correspond à la séquence de l'oligonucléotide utilisé lors de la réaction

QCM 9

Parmi les propositions suivantes concernant la technique d'hybridation *in situ* fluorescente ou technique de FISH, laquelle (lesquelles) est (sont) fausse(s) ?

- A. La technique consiste à utiliser des sondes marquées par une substance fluorescente
- B. Le principe de cette technique consiste à repérer des séquences d'ADN sur un chromosome grâce à l'hybridation de ces séquences avec une sonde complémentaire fluorescente
- C. Cette technique permet de mettre en évidence toutes les anomalies chromosomiques
- D. Cette technique permet l'obtention d'un caryotype
- E. Cette technique peut être utilisée sur des cellules en interphase

QCM 10

Parmi les propositions suivantes concernant la technique d'hybridation génomique comparative (CGH-array), indiquez celle(s) qui est/sont exacte(s) :

- A. Elle permet de mettre en évidence les aneuploïdies
- B. Elle permet de mettre en évidence les translocations chromosomiques équilibrées
- C. Elle permet de mettre en évidence les CNV (ou CNP)
- D. Elle permet de mettre en évidence les SNP

- E. Elle est la technique de choix pour analyser les syndromes microdélétionnels

QCM 11

Parmi les propositions suivantes, quelles sont les méthodes permettant de mettre en évidence des mutations ponctuelles au sein d'une séquence codante ?

- A. PCR – séquençage selon la méthode de Sanger
- B. RT-PCR – séquençage selon la méthode de Sanger
- C. Hybridation génomique comparative (CGH array)
- D. Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)
- E. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)

QCM 12

Parmi les propositions suivantes, quelles sont les méthodes permettant de mettre en évidence de grands réarrangements géniques ?

- A. PCR – séquençage selon la méthode de Sanger
- B. RT-PCR – séquençage selon la méthode de Sanger
- C. Hybridation génomique comparative (CGH-array)
- D. Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)
- E. *Southern blot*

QCM 13

Parmi les propositions suivantes concernant les méthodes d'études des polymorphismes de l'ADN, lesquelles sont justes ?

- A. Les microsatellites polymorphes de type (CA)_n sont étudiés par *Southern blot*
- B. Les microsatellites polymorphes de type (CA)_n peuvent être étudiés par PCR
- C. Les SNP peuvent être étudiés par PCR suivie d'une réaction de séquençage par la méthode de Sanger
- D. Les SNP peuvent être étudiés par PCR spécifique d'allèle
- E. Les SNP peuvent être étudiés par PCR suivie d'une digestion par une enzyme de restriction (PCR/RFLP)

QCS 1

Toutes les propositions suivantes concernant la PCR sont exactes sauf une. Laquelle ?

- A. Est une technique d'amplification génique *in vitro*
- B. Repose sur l'utilisation d'une enzyme, l'ADN polymérase
- C. Les oligonucléotides utilisés apportent les bases puriques et pyrimidiques nécessaires à la formation d'un brin d'ADN
- D. *Thermus aquaticus* est une bactérie thermophile ayant permis d'isoler la *Taq* polymérase
- E. Le produit d'amplification est visualisable après électrophorèse en gel d'agarose et coloration par le bromure d'éthidium

► Complément en ligne

Un complément numérique est associé à ce chapitre (il est indiqué dans le texte par un picto ). Il propose une photo supplémentaire. Pour voir ce complément, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 10.3

Représentation des différents types de fluorescence utilisés pour la PCR en temps réel.

A : chimie TaqMan®. Cette technologie met à profit l'activité 5' → 3' exonucléasique de la *Taq* polymérase. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde doublement marquée est non fluorescente en raison de l'extinction (*quenching*) de la fluorescence du fluorophore rapporteur FAM par le fluorophore quencher TAMRA situé à proximité. Lors de l'étape de polymérisation, la sonde est dégradée par la *Taq* polymérase (activité 5' → 3' exonucléasique). Le

fluorophore rapporteur libre émet alors un signal après excitation (perte du *quenching*). Ce signal de fluorescence est enregistré à la fin de l'étape de polymérisation.

B : sondes d'hybridation. Lors de l'étape d'hybridation, les deux sondes se fixent sur le même brin matrice et sont séparées par une à trois pb. Après excitation, le fluorophore (FITC) en 3' de la première sonde émet une quantité d'énergie capable d'exciter le fluorophore (Red 640) en 5' de la deuxième sonde (*fluorescence resonance energy transfer* [FRET]). L'émission du signal à 640 nm est enregistrée à la fin de l'étape d'hybridation.

C : utilisation du SYBR® Green (SG). En présence d'ADN double brin, le SYBR® Green s'intercale au niveau des sillons d'ADN. Il émet alors une fluorescence à 530 nm après excitation à 470 nm. L'enregistrement de la fluorescence s'effectue après polymérisation.



This page intentionally left blank

Le séquençage de nouvelle génération

Principe, applications en diagnostic et perspectives

Benoît Arveiler, Martin Krahn

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	134
Principe du séquençage de nouvelle génération	134
Principaux domaines d'application du séquençage de nouvelle génération en génétique médicale	138
Perspectives	141



L'essentiel à retenir

Le séquençage de nouvelle génération (NGS, pour *next-generation sequencing*) repose sur la génération massive de données de séquences obtenues par des cycles successifs d'incorporation de nucléotides, conduisant à l'émission de signaux qui sont ensuite convertis en information de séquence.

En raison de la quantité très importante de données de séquence générées, le versant analytique s'est complexifié et repose aujourd'hui largement sur l'utilisation d'outils bio-informatiques pour le traitement et l'interprétation des données mutationnelles. Le séquençage de nouvelle génération permet dorénavant d'effectuer l'analyse simultanée de la séquence de dizaines ou centaines de gènes d'intérêt (analyse de « listes de gènes », également appelée approche « panel de gènes »), voire même de la totalité des séquences codantes de tous les gènes du génome (approche « exome »), ou du génome dans son intégralité.

Initialement réservée à des applications dans le domaine de la recherche, l'utilisation du séquençage de nouvelle génération s'élargit maintenant par une implantation progressive pour des applications diagnostiques.

Introduction

La détermination de la séquence de molécules d'ADN reposait depuis les années 1970 sur les premières méthodes de séquençage développées par Allan Maxam, Walter Gilbert (États-Unis) et Frederick Sanger (Royaume-Uni) (voir [chapitre 10, « Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène »](#)). Ces méthodes ont progressivement été automatisées, notamment la méthode de séquençage selon Sanger, ce qui a permis une augmentation constante des capacités de séquençage. Néanmoins, l'utilisation de ces méthodes pour le séquençage de génomes s'est heurtée, malgré des améliorations successives, à des limitations de coûts et de débit de quantités de séquences pouvant être générées. Bien que le projet « Human Genome Project » de séquençage du génome humain [1] ait été réalisé grâce au séquençage automatisé de type Sanger, l'ampleur des moyens nécessaires comprenant plus de 10 ans de travail et un investissement d'environ 3 milliards de dollars par les différents centres de recherche impliqués dans le consortium international HUGO (Human Genome Organisation), rendait illusoire toute application « routinière » de séquençage de génomes humains individuels à des fins de recherche ou médicales.

C'est dans ce contexte qu'ont été développées depuis 2005 de nouvelles technologies de séquençage que l'on appelle techniques de « séquençage de nouvelle génération » (NGS; le terme de « séquençage massif parallèle » est également utilisé).

Ces nouvelles technologies ont conduit à un changement considérable d'échelle quant aux quantités de données de séquence pouvant être générées, certaines plateformes permettant aujourd'hui de produire les données de séquence de génomes humains individuels en l'espace de quelques jours, avec des coûts de quelques milliers d'euros.

L'objectif de ce chapitre est de présenter les principes et principaux domaines d'application du séquençage de nouvelle génération, qui constituera dorénavant l'outil essentiel pour le diagnostic moléculaire en génétique médicale.

Principe du séquençage de nouvelle génération

Principales étapes du processus de séquençage de nouvelle génération permettant la génération de données de séquençage

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) repose sur la génération massive de données de séquences obtenues par des cycles successifs d'incorporation de nucléotides, conduisant à l'émission de signaux qui sont ensuite convertis en information de séquence. Les signaux générés par l'incorporation de nucléotides sont de différentes natures, selon les technologies de NGS utilisées. Actuellement, on distingue essentiellement trois technologies majeures [2] :

- le pyroséquençage (société Roche 454) basé sur l'émission de signaux de photoluminescence lors de l'incorporation de nucléotides;
- le séquençage par incorporation de nucléotides modifiés fluorescents (société Illumina);
- le séquençage par mesure de différentiels de conductivité (mesure de variations de pH) lors de l'incorporation de nucléotides (société Thermo Fisher-Ion Torrent).

Néanmoins, le processus de NGS ne se limite pas à la seule étape de séquençage proprement dite, mais comporte une succession d'étapes importantes. Malgré des spécificités propres à chacune d'entre elles, les différentes technologies de NGS suivent globalement une même succession d'étapes essentielles ([figure 11.1](#)). Ces étapes sont détaillées ci-dessous telles qu'elles existent pour le séquençage d'ADN génomique, mais s'appliquent également à

d'autres utilisations du NGS, si nécessaire avec des modifications adéquates :

- une **étape de fragmentation (mécanique ou enzymatique) de l'échantillon** à séquencer, permet l'obtention de fragments d'ADN de taille adaptée aux étapes suivantes, et ceci de manière variable en fonction de la technologie ;
- une **étape optionnelle de mélange de différents échantillons** (multiplexage d'échantillons) est possible, par l'ajout de courtes séquences nucléotidiques qui déterminent un « code-barres » de séquence spécifique pour chaque échantillon. Le « code-barres » spécifique respectif sera lu à l'étape de séquençage, en même temps que la séquence de l'échantillon, et permettra ainsi de réattribuer les données de séquençage à chaque échantillon. Puisque la quantité totale de bases pouvant être déterminées lors de l'étape de séquençage est fixe (en fonction de la technologie, de la plateforme de NGS et du type de réactifs utilisés), le séquençage simultané d'échantillons différents réduit la quantité totale de bases séquencées et attribuées aux échantillons respectifs, de manière proportionnelle au nombre d'échantillons ;
- une **étape d'enrichissement en régions d'intérêt** : cette étape consiste à sélectionner les régions cibles à séquencer parmi la totalité de l'échantillon. Différents procédés permettent cet enrichissement en régions cibles. Il s'agit principalement de procédés basés sur la *capture de séquences* (utilisation de sondes spécifiques, complémentaires aux séquences cibles et permettant par phénomène d'hybridation moléculaire spécifique de « retenir » les séquences d'intérêt), ou sur la technique de PCR multiplex (*polymerase chain reaction CNIAL*, voir [chapitre 10, « Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène »](#)) avec utilisation de dizaines, centaines ou milliers de couples d'amorces permettant une amplification sélective et simultanée des séquences d'intérêt, mais d'autres approches d'enrichissement existent. L'étape d'enrichissement permettra ainsi de ne « retenir » pour le séquençage que les régions d'intérêt, le plus souvent un ensemble d'exons codants de différents gènes (approche « **panel de gènes** »), ou la totalité des exons codants du génome (approche « **exome** »). Il est à noter que le séquençage de **génome** complet ne nécessite par définition par d'étape d'enrichissement (dans cette situation, la région d'intérêt est constituée par la totalité du génome) ;
- une **étape d'amplification clonale** : pendant cette étape, les fragments d'ADN à séquencer sont amplifiés de manière clonale et isolée, selon les spécificités de chaque technologie de séquençage. Il s'agit surtout de procédés d'amplification clonale en « îlots » (ou *clusters*) sur support solide, ou en « microréacteurs » constitués par des

mélanges réactionnels de type micro-micelles répartis dans des micro-puits ;

- une **étape de séquençage**, basée sur la génération et la détection de signaux successifs, de nature variable en fonction de la technologie de séquençage (photoluminescence, fluorescence, variation de pH, etc.) et obtenus par l'incorporation de nucléotides selon le principe de complémentarité, permettant ainsi la détermination de la séquence de la région d'intérêt (étape de détermination des bases, détaillée ci-dessous, « Principales stratégies du séquençage de nouvelle génération »). Pendant l'étape de séquençage, des millions de « lectures de séquence » (ou *sequence reads*, correspondant à des « fragments » de la région d'intérêt) sont déterminées de manière indépendante et devront être réassemblées durant les étapes d'analyse, pour reconstituer la séquence de la région d'intérêt. Ces lectures de séquence sont de longueurs variables en fonction de la technologie utilisée, habituellement de quelques dizaines de bases, et ne dépassant pas quelques centaines de bases. L'étape de séquençage comporte donc l'acquisition et le traitement des données brutes de séquençage.

Principales étapes d'analyse associées au séquençage de nouvelle génération

De la même manière que la génération des données de séquençage, l'analyse des données comporte des étapes essentielles ([figure 11.1](#)), impliquant largement le recours à des outils du domaine de la bio-informatique [3]. Il est important de noter que l'analyse des données de séquençage issues du NGS est associée à un vocabulaire particulier, qu'il est important de maîtriser. Les principales étapes d'analyse sont les suivantes :

- **étape de détermination des bases** (*base calling*) : il s'agit de l'étape permettant la transformation des signaux générés par l'incorporation successive de nucléotides (données brutes) en données de séquence ;
- **étape de filtrage** pour éliminer les lectures de séquence de qualité inférieure à un seuil fixé ;
- **étape d'alignement** : cette étape permet le positionnement des lectures de séquence générées par rapport à la séquence de référence ;
- **étape d'analyse de la profondeur de lecture et de la couverture de séquence** ([figure 11.2](#)) : ces deux paramètres importants peuvent être déterminés suite à l'étape d'alignement, en fonction de la taille de la région d'intérêt à séquencer, la quantité totale de bases pouvant être déterminées lors de l'étape de séquençage, et l'éventuel multiplexage

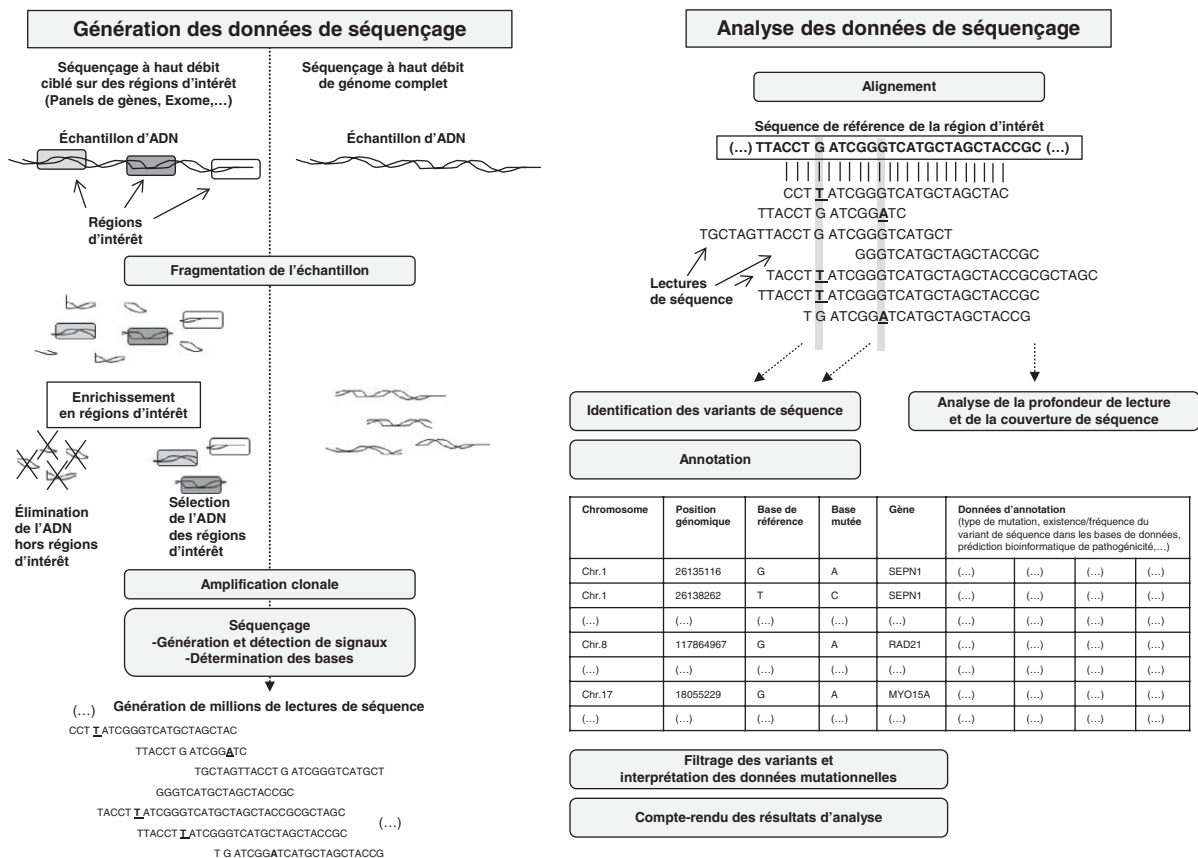


Figure 11.1

Principales étapes du processus de NGS.

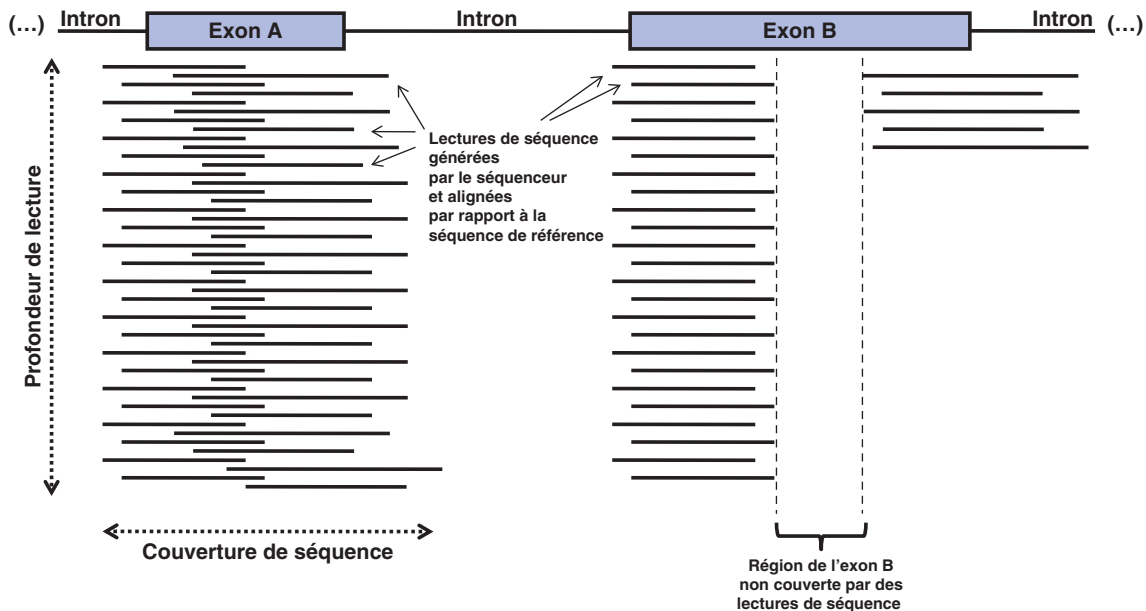


Figure 11.2

Représentation schématique des notions de profondeur de lecture et couverture de séquence.

La profondeur de lecture correspond au nombre de lectures indépendantes d'une base par le séquenceur. La couverture de séquence correspond au pourcentage de bases séquencées par des lectures indépendantes, par rapport au nombre total de bases de la région d'intérêt (ou de toute sous-région d'intérêt).

des échantillons. La **profondeur de lecture** correspond au nombre de lectures indépendantes d'une base par le séquenceur (le nombre de fois est spécifié par un «X»; par exemple «100X»). Cette valeur peut être déterminée pour des bases précises ou en moyenne pour la région d'intérêt ou toute sous-région d'intérêt (par exemple la profondeur de lecture moyenne pour un exon donné d'un gène faisant partie de la région d'intérêt). Pour la détection de mutations germinales, la profondeur de lecture minimum voulue est habituellement de 20X. La **couverture de séquence** correspond au pourcentage de bases séquencées par des lectures indépendantes, par rapport au nombre total de bases de la région d'intérêt (ou de toute sous-région d'intérêt). La valeur est donnée pour une profondeur de lecture donnée. Pour la détection de mutations germinales, l'objectif est une couverture de toute la région d'intérêt la plus proche possible de 100 % à une profondeur de lecture de 20X minimum. Ceci signifie que la séquence de toutes les bases de la région d'intérêt (soit une couverture de 100 %) aura été déterminée pendant le processus de séquençage par au moins 20 lectures de séquence indépendantes (20X). Bien entendu, une couverture de séquence incomplète sera source d'erreur, puisque des mutations localisées dans les régions non correctement «couvertes» (donc séquencées de manière insuffisante) ne seront pas correctement détectées et donc responsables d'une perte de sensibilité du processus de séquençage;

- **étape d'identification des variants de séquence** (*variant calling*) : ce stade de l'analyse permet l'identification de variants de séquence entre les lectures et la séquence de référence. Le nombre de variants de séquence identifiés pour un échantillon dépend du type d'analyse effectué (à titre d'exemple, environ 30 000 variants de séquence sont identifiés lors d'un séquençage d'exome, et environ 3 millions de variants de séquence pour un séquençage de génome complet);
- **étape d'annotation** : il s'agit de la compilation d'informations disponibles concernant chacun des variants identifiés, pour l'interprétation des données mutationnelles. Les informations pouvant être recueillies pour les variants identifiés sont très diverses (selon le gène impliqué, le type de mutation, la localisation exonique ou non, la fréquence du variant de séquence dans différentes bases de données, la prédiction bio-informatique avec détermination de scores de pathogénicité, etc.) et nécessitent la consultation de bases de données (voir [chapitre 24, «Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique»](#)). L'annotation des variants identifiés permettra ensuite d'appliquer des filtres (voir aussi ci-dessous «Séquençage de l'exome»), dont l'objectif est habituellement de ne retenir que les

variants considérés comme délétères ou potentiellement délétères, en lien avec le contexte clinique de l'échantillon analysé. Il est important de souligner que l'interaction avec le médecin clinicien est essentielle pour l'interprétation des données mutationnelles. En effet, de même que pour l'analyse de CGH-array, il est impossible d'interpréter correctement des résultats de NGS en l'absence de données cliniques et paracliniques.

Principales stratégies du séquençage de nouvelle génération

L'utilité du NGS en génétique médicale est principalement liée à la quantité de séquences qui peuvent être produites en une seule expérience. En effet, alors que les séquenceurs de type Sanger les plus puissants ont des capacités de séquençage maximales de l'ordre de 300 000 bases par expérience, les séquenceurs de nouvelle génération permettent, pour les plus petits, de séquencer de l'ordre de 100 millions de bases (soit une capacité 300 fois supérieure), et pour les plus puissants de séquencer de l'ordre de 1 000 milliards de bases (1 000 Gb; soit une capacité encore 10 000 fois supérieure). L'on parle de séquençage à moyen débit (100 Mb à 1 Gb), à haut débit (10 à 100 Gb), et à très haut débit (> 1 000 Gb).

Cette très haute capacité de séquençage rend possible des projets nécessitant de hauts débits. Il est possible par exemple de calculer la capacité de séquençage nécessaire pour séquencer le **génom**e d'un individu. Le génome comprend 3 milliards de paires de bases (3 Gb). Afin d'assurer une bonne qualité du séquençage en vue de la recherche de variants, une *profondeur de lecture* moyenne de 50X est souhaitable (cela signifie que chaque base du génome est séquencée 50 fois en moyenne). Le séquençage de l'intégralité du **génom**e d'un individu nécessite donc une capacité de séquençage de 150 Gb. Ainsi, un séquenceur avec un débit de 1 000 Gb permet-il de séquencer le génome de 6 ou 7 individus simultanément avec une profondeur de lecture de 50X.

Sachant qu'environ 85–90 % des mutations responsables de maladies génétiques sont localisées dans les exons des gènes codant pour des protéines, un séquençage de l'ensemble des exons compris dans le génome (soit plus de 200 000 exons au total) constitue une alternative intéressante au séquençage du génome entier. On parle de séquençage de l'**exome**, qui correspond à environ 1 % du génome, et donc de l'ordre de 30 Mb. Un séquenceur avec une capacité de 1 000 Gb permet donc de séquencer simultanément l'exome de 600 à 700 individus avec une profondeur de lecture de 50X.

Le NGS trouve également son utilité dans des applications de moyen débit. Un séquençage limité à un groupe de gènes (**panels de gènes**) impliqués dans une pathologie ou un ensemble de pathologies est en effet parfois bien adapté aux besoins. Un panel contenant les exons d'une cinquantaine de gènes peut être séquençé avec une profondeur de 100X chez 10–15 patients simultanément sur un séquenceur à moyen débit.

Le NGS permet également de caractériser les points de cassures d'anomalies chromosomiques telles que des *translocations*. Pour cela, un séquençage entier du génome est réalisé par la technique appelée *paired-end* : il s'agit de séquencer les deux extrémités de chaque fragment cible du séquençage. Des logiciels d'*alignement* de séquences permettent d'indiquer si les deux extrémités du fragment sont alignées sur la séquence de référence du génome ou au contraire appartiennent à des régions distinctes (du même chromosome ou de chromosomes différents) (e-figure 11.3). Dans le cas des translocations, l'analyse des données de séquençage est ciblée sur la recherche de fragments génomiques comprenant des séquences se retrouvant juxtaposées sur le chromosome transloqué, alors qu'elles sont normalement localisées sur des chromosomes différents. Cette même approche peut être utilisée pour caractériser des *délétions*, des *inversions* chromosomiques, ou encore des réarrangements complexes faisant intervenir de multiples événements.

Le NGS peut en outre être utilisé pour séquencer l'ensemble des ARN présents dans une lignée cellulaire ou un tissu (méthode appelée RNAseq). L'ARN est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). L'ensemble des ADNc est ensuite séquençé, ce qui permet de répertorier l'ensemble des transcrits présents dans l'échantillon étudié, et correspondant à l'ensemble des gènes exprimés et des transcrits alternatifs de ces gènes. Le comptage du nombre de fois où un ADNc est séquençé permet de quantifier le niveau d'expression du transcrit. Ainsi, le séquençage de nouvelle génération permet l'analyse du **transcriptome**, qui se définit comme la description qualitative et quantitative de l'ensemble des transcrits présents dans un échantillon biologique.

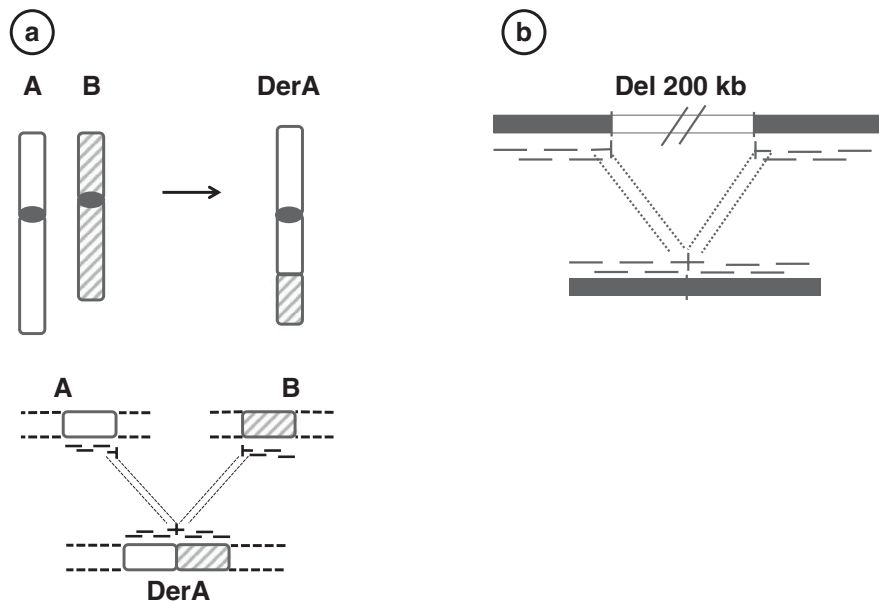
Enfin, le NGS peut être mis à profit pour un éventail très important d'autres applications, notamment celles visant à étudier à l'échelle du génome les interactions entre régions génomiques distantes (notamment technique «5c», pour *carbon-copy chromosome conformation capture*), les interactions entre certaines protéines et l'ADN (ChIPSeq, pour *chromatin immunoprecipitation and sequencing*), ou encore les régions décondensées de la chromatine réputées les plus actives sur le plan transcriptionnel (FAIRE Seq, pour

formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements and sequencing). Nous ne décrivons ici que le principe de la technique ChIPSeq. L'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) permet d'isoler de façon spécifique au sein de la chromatine les séquences génomiques interagissant avec une protéine d'intérêt particulier (par exemple facteur de transcription, histones acétylées ou méthylées marquant sélectivement des régions actives ou au contraire silencieuses sur le plan transcriptionnel), ou les séquences d'ADN méthylées. Brièvement, la chromatine est « figée » à l'aide de formaldéhyde, qui forme des liaisons covalentes entre l'ADN et les protéines (on parle de « réticulation »). La chromatine est alors fragmentée par sonication (par l'effet d'ultrasons) puis mélangée avec des billes portant à leur surface des anticorps dirigés contre la ou les protéine(s) cible(s) afin d'isoler sélectivement les régions de la chromatine portant cette/ces protéine(s). Après extraction de l'ADN, les fragments d'ADN sont séquençés, ce qui permet d'identifier sur le génome l'ensemble des sites concernés (e-figure 11.4).

Principaux domaines d'application du séquençage de nouvelle génération en génétique médicale

Analyse ciblée d'un ensemble de gènes (approche « panel de gènes »)

Le séquençage de nouvelle génération est désormais un outil incontournable dans les laboratoires hospitaliers de diagnostic des maladies génétiques. Le débit important permet en effet d'analyser en même temps plusieurs gènes chez plusieurs patients. Ceci est notamment intéressant dans le cas des maladies présentant une forte *hétérogénéité génétique*, c'est-à-dire pour lesquelles des mutations peuvent être trouvées dans un grand nombre de gènes différents. Ainsi, par exemple, des mutations ont été trouvées dans plus de 400 gènes chez des patients avec déficience intellectuelle. L'analyse simultanée de l'ensemble de ces gènes permet d'atteindre un degré d'exhaustivité inatteignable par d'autres approches, ce qui constitue un progrès très important pour le diagnostic et le conseil génétique. De la même façon, on peut envisager des analyses portant sur quelques dizaines ou centaines de gènes ciblés dans le domaine des cancers, des maladies neuromusculaires, des surdités, ou des rétinites pigmentaires par exemple.

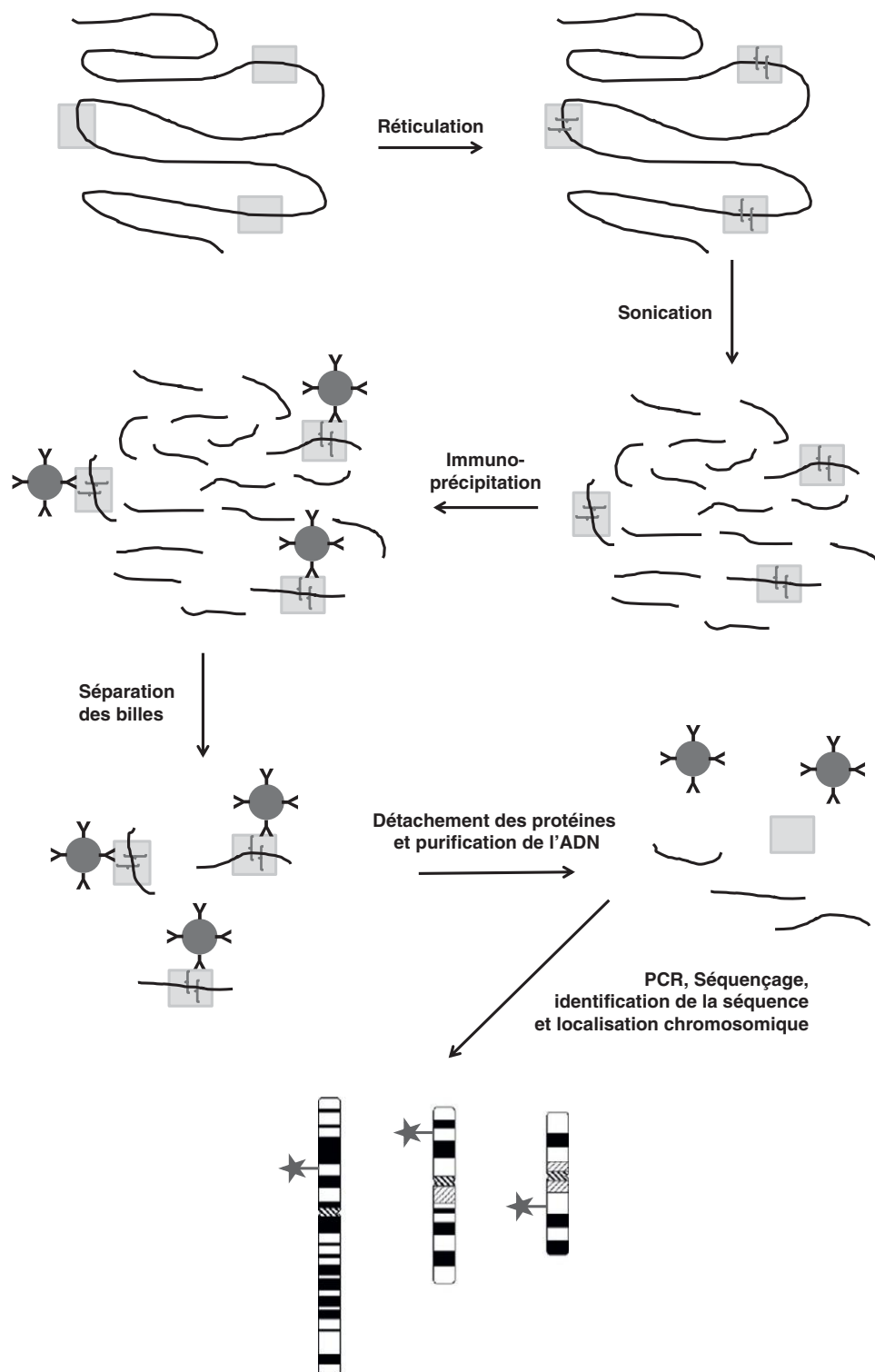


e-figure 11.3

Utilisation du séquençage de nouvelle génération pour étudier des réarrangements génomiques.

A. Séquençage des points de cassure d'une translocation. Les deux chromosomes impliqués dans la translocation sont indiqués par A (blanc) et B (hachuré). DerA indique le chromosome dérivatif A. La partie basse de la figure schématise le séquençage de la région englobant le point de cassure de la translocation sur le chromosome DerA. Les traits horizontaux représentent des morceaux de séquence de l'ordre de 200 pb. Par alignement de séquence, chacune des séquences est attribuée au chromosome d'origine (A ou B). Le point de cassure est identifié car le segment séquencé contient pour partie des séquences appartenant au chromosome A et pour partie au chromosome B.

B. Mise en évidence d'une microdélétion. Un segment chromosomique est schématisé en noir. Le segment de 250 kb délété est en blanc. Les traits horizontaux représentent des morceaux de séquence de l'ordre de 200 pb. Par alignement de séquence, chacune des séquences est localisée sur le chromosome de part et d'autre des points de cassure de la délétion. Les points de cassure sont identifiés car le segment séquencé contient pour partie des séquences situées en amont et pour partie des séquences situées en aval des points de cassure.



e-figure 11.4

Immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage de nouvelle génération.

La chromatine, schématisée par un filament d'ADN sur lequel est liée à certains sites une protéine d'intérêt tel qu'un facteur de transcription (rectangle gris) est isolée à partir d'un échantillon biologique (culture cellulaire, par exemple). Le formaldéhyde est utilisé pour fixer la protéine sur l'ADN dans une étape dite de réticulation. La chromatine est alors soniquée en fragments de taille réduite, puis immunoprécipitée à l'aide de billes recouvertes d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Ceci permet de séparer les billes portant les fragments de chromatine d'intérêt du reste de la chromatine. Après extraction, l'ADN englobé dans la chromatine, ainsi isolée, est purifié, puis séquencé de façon à identifier l'ensemble des loci génomiques se liant à la protéine d'intérêt.

L'utilisation d'un séquenceur à moyen, haut ou très haut débit sera dictée par le nombre de gènes à étudier d'une part, et par le nombre d'échantillons que l'on veut séquencer simultanément, d'autre part. Pour chacun des gènes, le choix des séquences analysées se limite généralement aux exons ainsi qu'à quelques dizaines de paires de bases des introns flanquants de façon à séquencer les jonctions introns-exons, qui contiennent les sites consensus d'épissage de l'ARN. L'ajout de régions géniques supplémentaires telles que le promoteur et certains introns d'intérêt particulier est bien entendu possible.

Cette nouvelle technologie améliore grandement l'offre de diagnostic moléculaire proposée aux patients, en termes à la fois d'exhaustivité des gènes pouvant être analysés et de rapidité d'exécution. Alors que l'analyse séquentielle avec la technique de Sanger des différents gènes impliqués dans une maladie peut nécessiter plusieurs mois voire 1 à 2 ans, les temps d'analyse devraient se trouver réduits à quelques semaines ou mois grâce au NGS.

L'utilisation du NGS en diagnostic permet la recherche de substitutions ou de petites délétions/insertions de quelques nucléotides. L'identification de réarrangements de grande taille, telles que des délétions emportant tout ou partie d'un gène ou d'une région génomique, est également possible avec une analyse bio-informatique adaptée. Elle repose sur la mise en évidence d'une diminution anormale de la profondeur de lecture de la séquence au niveau des segments délétés. En effet, l'existence d'une délétion hétérozygote se traduit par une diminution de la profondeur de lecture de 50 %. Une délétion homozygote se traduit par l'absence totale de couverture de la région correspondante. Au contraire, l'existence d'une duplication à l'état hétérozygote se traduit par une augmentation de la profondeur de lecture de 1,5 fois.

Séquençage de l'exome

Dans le cas de certaines maladies, il est très difficile, voire impossible, de définir un ensemble de gènes candidats à tester pour réaliser un diagnostic. C'est le cas notamment des syndromes polymalformatifs liés à des anomalies du développement embryonnaire, d'une part car le nombre de gènes déjà connus est élevé, d'autre part car l'ensemble des gènes impliqués dans ces pathologies n'est, de loin, pas identifié. Dans ce cas, la solution est de réaliser un séquençage de l'exome du patient, ce qui permet de rechercher des mutations sans *a priori* et peut conduire à l'identification de mutations dans des gènes déjà connus, ou dans des gènes nouveaux. Lors du séquençage de l'exome, environ 30 000 variants sont mis en évidence par rapport à la séquence de

référence du génome humain. Il est donc nécessaire d'effectuer un tri afin d'identifier, selon le mode d'hérédité connu ou présumé, la mutation ou les deux mutations qui sont responsables de la maladie. Une série de filtres est appliquée de façon à restreindre progressivement le nombre de variants à étudier.

Les principaux filtres sont les suivants :

- en fonction du mode d'hérédité, selon que l'on s'adresse à une maladie autosomique dominante ou récessive, ou à une maladie liée au chromosome X, on va sélectionner les gènes portant soit une soit deux mutations chez les patients;
- si plusieurs individus atteints et non atteints d'une même famille sont analysés, ce qui est utile chaque fois que cela est possible, un filtrage est effectué en prenant en compte la transmission des variants; ainsi, dans une maladie dominante autosomique tous les patients atteints doivent partager les mêmes variants et, au contraire, les individus sains ne doivent pas (sauf hypothèse de pénétrance incomplète) partager ces variants; dans les maladies récessives les individus atteints devront partager les mêmes deux variants (soit à l'état homozygote, soit à l'état hétérozygote composite), les parents devront présenter chacun l'une des mutations à l'état hétérozygote; les frères et sœurs sains présenteront l'une ou l'autre des deux mutations à l'état hétérozygote, ou aucune des deux mutations;
- dans les maladies récessives, si l'on étudie des familles consanguines, on sélectionnera les gènes présentant des mutations à l'état homozygote chez les patients;
- il est fréquent dans les maladies dominantes que des parents sains, non porteurs d'une mutation, donnent naissance à un enfant atteint car une mutation, dite *de novo*, s'est produite dans l'une des lignées germinales; dans ce cas de figure, l'exome de l'enfant et des deux parents est séquençé (stratégie « trio ») et l'on sélectionne les variants présents uniquement chez l'enfant atteint et absents chez les parents;
- les variants répertoriés dans les banques de données comme de simples polymorphismes sont éliminés;
- dans le cadre des maladies rares, les variants dont la fréquence est supérieure à 1 % dans différentes banques de données sont classiquement éliminés;
- dans le cas des maladies récessives, tous les variants présents à l'état homozygote chez des sujets sains dans les banques de données sont éliminés;
- si des hypothèses peuvent être formulées, les gènes peuvent être sélectionnés sur la base de leur fonction potentielle ou de leur profil d'expression spatio-temporel;
- l'utilisation de logiciels bio-informatiques spécifiques permet d'évaluer la pathogénicité des variants, ce qui permet

de sélectionner les variants considérés comme pathogènes et d'éliminer les variants considérés comme bénins;

- enfin, et de façon importante, il faut toujours s'assurer que les variants détectés ne sont pas des artéfacts et ont une réalité biologique; il convient donc de confirmer leur existence par la classique technique de séquençage selon la méthode enzymatique de Sanger.

Cette stratégie d'application de filtres est utilisée non seulement pour les analyses d'exome, mais d'une manière générale lors de l'analyse de panels de gènes, et ceci d'autant plus que le nombre de gènes analysés est important. Il convient de noter que chacun de ces filtres doit être paramétré avec précaution et sens critique, car ils résultent de choix faits sur la base d'hypothèses particulières (mode de transmission, fréquence seuil pour retenir ou éliminer des variants, etc.) qui peuvent éventuellement être remises en question. De même, la pathogénicité de certains variants peut être difficile à établir (variants de type faux-sens notamment). Des analyses fonctionnelles peuvent être nécessaires pour tenter de confirmer l'implication de ces variants dans la maladie.

Séquençage du génome

Le séquençage de l'intégralité du génome peut être envisagé si aucune mutation n'est identifiée dans les exons des gènes et si l'existence de mutations ou anomalies génomiques localisées dans les introns ou les séquences régulatrices du gène est suspectée (voir [chapitre 3, «Structure et fonction du génome humain»](#)). La quantité de données générée est cependant 100 fois plus élevée que pour l'exome (environ 3 millions de variants de séquence identifiés pour un génome humain séquencé) et l'interprétation de la pathogénicité des innombrables variants identifiés devient extrêmement lourde et complexe.

Séquençage à très haut niveau de profondeur de lecture

Un dernier domaine d'application du NGS est celui dans lequel de très hauts niveaux de profondeur de lecture sont nécessaires. Nous décrivons ici deux grands types d'applications.

Recherche de mutations en mosaïque somatique ou à l'état hétéroplasmique

Le premier concerne la recherche d'événements somatiques rares, que ce soit dans le cadre de la génétique somatique des cancers ou dans le cadre particulier de maladies

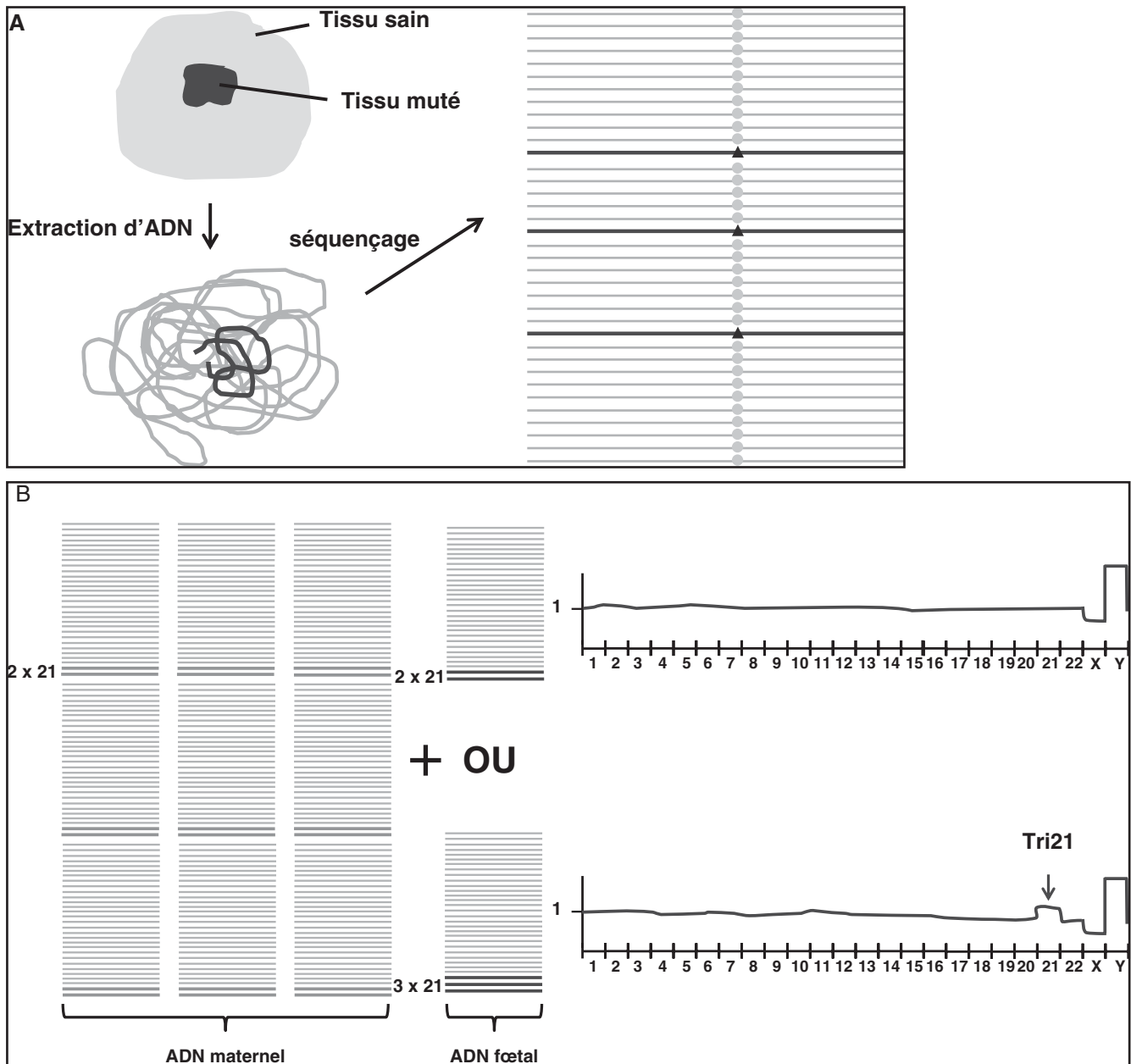
génétiques dans lesquelles les mutations ne sont pas présentes à l'état constitutionnel, mais à l'état de mosaïque somatique dans certains tissus particuliers ([e-figure 11.5A](#)). Dans les deux cas, la recherche de mutation est effectuée sur un échantillon qui n'est pas pur, parce que comportant un mélange de cellules porteuses et non porteuses de la mutation (tissu tumoral mélangé avec du tissu sain environnant dans un cas, tissu inhomogène dans le second cas). Il est nécessaire de réaliser le séquençage à des profondeurs moyennes de lecture de 500 à 1 000 fois ou plus afin d'être capable de repérer des mutations qui ne sont parfois présentes que sur quelques pourcents des molécules séquencées.

Le même problème se posera pour les mutations de l'ADN mitochondrial (voir [chapitre 20, «Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies mitochondriales»](#)), lesquelles sont souvent à l'état hétéroplasmique. Une profondeur de 1000X peut être nécessaire lorsque le tissu disponible n'est pas adéquat pour la recherche de mutation (ex. : ADN de leucocytes lorsqu'une biopsie de muscle n'a pu être réalisée).

Diagnostic non invasif

La deuxième application tirant profit des profondeurs de lecture élevées atteignables par NGS concerne le diagnostic prénatal non invasif (DPNI) de mutations géniques ou d'aneuploïdies (voir [chapitre 15, «Diagnostic prénatal et préimplantatoire»](#)) et le diagnostic de tumeurs. Le DPNI est réalisé par étude de l'ADN libre (acellulaire) circulant (ADNct).

Le DPNI est pratiqué par étude de l'ADNct du fœtus dans le sang maternel. Cet ADN libre total contient 90 à 95 % d'ADN maternel, et 5 à 10 % seulement d'ADN fœtal. Dans le cas de la recherche de mutations géniques, la/les (selon qu'il s'agit d'une maladie dominante ou récessive) mutation/s familiale/s étant connue/s, seuls les exons du gène impliqué sont séquencés. Le haut niveau de profondeur de lecture permet d'observer au milieu des séquences maternelles les allèles du fœtus. La présence ou non de la mutation paternelle (dans le cas où elle existe, et si elle est distincte de celle de la mère) est révélée assez aisément. Pour ce qui concerne la mutation maternelle, sa présence ou non dans l'ADN fœtal doit être révélée par une estimation du nombre de fois où le nucléotide normal ou muté est présent dans la séquence. Si le fœtus porte la mutation maternelle (cas 1), alors les deux nucléotides, normal et mutant, sont chacun présents à 50 % dans la séquence. Si au contraire le fœtus ne porte pas la mutation maternelle (cas 2) alors une faible majorité des séquences (55 à



e-figure 11.5

Mise à profit de la haute profondeur de lecture du séquençage de nouvelle génération pour identifier des séquences diluées.

A. Mise en évidence d'une mutation en mosaïque. Une biopsie a été réalisée et comprend du tissu sain (en gris) et du tissu porteur d'une mutation (objectivé en noir). L'ADN extrait de la biopsie provient pour 90 % du tissu sain (filament gris) et pour 10 % du tissu muté (filament noir). L'ADN est séquençé. Chaque molécule porteuse du nucléotide normal (brin gris, boule grise) et du nucléotide muté (brin noir, triangle noir) est identifiée de façon individuelle, ce qui permet d'observer la mutation malgré sa faible représentation (10 %).

B. Analyse d'ADN fœtal dans le sang maternel. L'ADN libre circulant dans le sang maternel a été extrait. Il contient 90 % d'ADN maternel (gris clair) et 10 % d'ADN fœtal (gris foncé). Deux cas de figure sont présentés. Dans le premier cas le fœtus de sexe masculin a un caryotype normal 46,XY. Dans le second cas le fœtus de sexe masculin est porteur d'une trisomie 21 (47,XY). Le séquençage de l'ensemble de l'ADN circulant indique l'existence de deux copies de chacun des autosomes chez le fœtus 46,XY (rapport du nombre de lecture échantillon test / échantillon de référence = 1) et d'une copie supplémentaire du chromosome 21 chez le fœtus 47,XY (rapport = 1,16).

60 %) portera le nucléotide normal, alors que le nucléotide mutant sera présent sur une faible minorité (40 à 45 %) des séquences. Des calculs statistiques doivent être effectués afin de pouvoir distinguer le génotype fœtal avec fiabilité. Avec une profondeur de lecture de 1000X, les nombres de lectures à comparer seront, dans le cas 1, de 500 pour les allèles normal et mutant et, dans le cas 2, de 400 à 450 pour l'allèle mutant et 550 à 600 pour l'allèle normal, ce qui permet d'atteindre une significativité statistique suffisante pour établir le diagnostic avec un bon degré de confiance. Ces chiffres seraient à diviser par 10 si la profondeur de lecture n'était que de 100X; le poids statistique ne serait alors pas suffisant pour établir un diagnostic.

Le cas d'une maladie récessive avec des mutations paternelle et maternelle identiques n'est pas exposé ici, mais les calculs peuvent être réalisés facilement pour ce cas de figure en suivant le même type de raisonnement que dans le cas exposé ci-dessus.

D'une manière similaire, la présence d'aneuploïdies fœtales telles que les trisomies 13, 18 ou 21 peut être détectée sur sang maternel (e-figure 11.5B). En effet, la détermination du nombre de lectures de séquences obtenues pour chaque chromosome, associée à la comparaison par rapport aux données de références de grossesses à caryotype fœtal normal, permet d'identifier les situations d'aneuploïdie. Par exemple, si le fœtus est porteur d'une trisomie 21 et sachant que les cellules maternelles ont un caryotype 46,XX, on doit trouver dans l'ADN extrait du sang maternel un léger excès (de 5 à 10 %) de séquences du chromosome 21 par rapport aux séquences des autres chromosomes.

Le diagnostic de tumeurs peut aussi se faire par recherche de mutation sur l'ADNct relargué par la tumeur. Cette technique très récente ne peut s'appliquer qu'aux tumeurs pour lesquelles une mutation somatique a été préalablement identifiée. Cette mutation, présente uniquement dans la tumeur et absente des tissus sains, permet de suivre la progression de la maladie ou de prévoir une récurrence. L'étude de l'ADNct est abordée par NGS mais peut aussi l'être par PCR digitale.

Perspectives

Le séquençage de nouvelle génération a révolutionné en quelques années les possibilités d'analyse du génome humain individuel et trouve, au-delà, de très nombreuses autres applications. L'utilisation du séquençage de nouvelle génération, initialement réservée pour des applications dans le domaine de la recherche, s'élargit maintenant par une implantation progressive dans les laboratoires hospi-

taliers pour des applications diagnostiques. Ces nouvelles technologies constitueront ainsi dans un avenir proche l'outil essentiel pour le diagnostic moléculaire en génétique médicale, mais aussi dans de nombreux autres domaines de la médecine.

Il est important de souligner que les différentes technologies de NGS évoluent encore rapidement. D'une part, les technologies existantes conduisent au développement de plateformes de NGS de plus en plus performantes avec l'objectif affiché de pouvoir séquencer dans quelques années des génomes humains individuels pour un millier d'euros, et ceci à l'échelle de populations entières. D'autre part, de nouvelles technologies sont mises au point, en particulier basées sur le séquençage de longues molécules d'ADN uniques. Ces progrès considérables de capacités de génération de données de séquences des différentes plateformes devront obligatoirement s'accompagner d'une croissance conjointe des capacités informatiques de stockage et d'analyse.

Concernant les nombreuses applications médicales envisageables, l'établissement d'un cadre juridique adapté et le questionnement éthique sont bien entendu d'une importance essentielle dans cette nouvelle ère du séquençage de nouvelle génération (voir chapitres 18, «Dispositions législatives entourant la pratique des tests génétiques», et 19, «Enjeux éthiques, juridiques et psychologiques en génétique médicale»). Les réflexions et travaux actuellement en cours dans ces domaines devront en particulier permettre une homogénéisation dans la prise en charge des patients, pour lesquels ces nouvelles procédures diagnostiques permettront non seulement d'identifier les mutations causales impliquées dans les pathologies motivant le séquençage de nouvelle génération, mais aussi de mettre en évidence des mutations dans des gènes non en rapport avec la pathologie pour laquelle le patient a initialement consulté. Ces découvertes «fortuites», comme une prédisposition à un cancer, posent des problèmes importants de prise en charge, qui devront être clarifiés rapidement à l'échelle nationale.

Finalement, il est essentiel que les nouvelles générations de médecins se familiarisent avec les concepts du séquençage de nouvelle génération, qui constituera dorénavant un versant majeur d'une médecine de plus en plus personnalisée.

Références

- [1] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45.

- [2] Buermans HP, den Dunnen JT. Next-generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim Biophys Acta* 1842; 2014: 1932–41.

- [3] Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next-generation sequencing. *Clin Chem* 2015; 61(1): 124–35.

ENTRAÎNEMENT 11 QCM

QCM 1

Concernant les principales étapes du séquençage massif parallèle d'ADN génomique permettant la génération de données de séquençage, quelle/s proposition/s est/sont exacte/s?

- A. Les échantillons d'intérêt doivent toujours être séquencés en parallèle de manière indépendante
- B. Les échantillons d'intérêt peuvent être séquencés de manière simultanée en mélangeant des échantillons après l'ajout de courtes séquences nucléotidiques qui déterminent un « code-barres » de séquence spécifique
- C. La quantité totale de bases pouvant être déterminée lors de l'étape de séquençage dépend de la technologie et de la plateforme de séquençage massif parallèle utilisées
- D. Le mélange d'échantillons d'intérêt à séquencer permet d'augmenter la quantité totale de bases pouvant être déterminées lors de l'étape de séquençage
- E. Le séquençage simultané d'échantillons d'intérêt réduit la quantité totale de bases séquencées et attribuées aux échantillons respectifs, de manière proportionnelle au nombre d'échantillons

QCM 2

Concernant les principales étapes du séquençage massif parallèle d'ADN génomique permettant la génération de données de séquençage, quelle/s proposition/s est/sont exacte/s?

- A. L'étape d'enrichissement en régions d'intérêt consiste à sélectionner les régions cibles à séquencer parmi la totalité de l'échantillon
- B. L'étape d'enrichissement en régions d'intérêt peut s'effectuer par le procédé de capture de séquences
- C. Le séquençage de génome complet comporte une étape d'enrichissement en régions d'intérêt
- D. Le séquençage d'exome comporte une étape d'enrichissement en régions d'intérêt
- E. L'étape d'amplification clonale est réalisée avant l'étape d'enrichissement en régions d'intérêt

QCM 3

Concernant les principales étapes du séquençage massif parallèle d'ADN génomique permettant la génération de données de séquençage, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s)?

- A. L'étape de séquençage est basée sur la génération et la détection de signaux successifs obtenus par l'incorporation de nucléotides selon le principe de complémentarité
- B. L'étape de séquençage comporte une étape de détection de fluorescence pour toutes les différentes technologies de séquençage massif parallèle existantes

- C. Les lectures de séquence sont de longueur identique entre les différentes technologies de séquençage massif parallèle utilisées

- D. La quantité totale de bases pouvant être déterminées lors de l'étape de séquençage est de quelques centaines à quelques milliers de bases, en fonction de la technologie et de la plateforme de séquençage massif parallèle utilisées

- E. La quantité totale de bases pouvant être déterminées lors de l'étape de séquençage est de quelques millions à quelques milliards de bases, en fonction de la technologie et de la plateforme de séquençage massif parallèle utilisées

QCM 4

Concernant les principales étapes d'analyses de données de séquençage massif parallèle d'ADN génomique, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s)?

- A. L'étape d'identification des variants de séquence (*variant calling*) permet la transformation des signaux générés par l'incorporation successive de nucléotides (données brutes), en données de séquence
- B. L'étape de détermination des bases (*base calling*) permet la transformation des signaux générés par l'incorporation successive de nucléotides (données brutes) en données de séquence
- C. L'étape d'identification des variants de séquence (*variant calling*) permet l'identification de variants de séquence entre les lectures et la séquence de référence
- D. L'étape d'alignement permet le positionnement des lectures de séquence générées par rapport à la séquence de référence
- E. L'étape d'alignement nécessite au préalable une étape d'identification des variants de séquence (*variant calling*)

QCM 5

Concernant les principales étapes d'analyses de données de séquençage massif parallèle d'ADN génomique, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s)?

- A. La profondeur de lecture correspond au nombre de lectures indépendantes d'une base par le séquenceur
- B. La profondeur de lecture correspond au nombre total de lectures de séquence générées par le séquenceur
- C. Pour la détection de mutations germinales, la profondeur de lecture minimum voulue est de 2X
- D. La couverture de séquence correspond au pourcentage de bases séquencées par des lectures indépendantes, par rapport au nombre total de bases de la région d'intérêt

E. Pour un variant donné, l'étape d'annotation peut comprendre le recueil d'informations relatives à la fréquence de ce variant dans la population générale

QCM 6

Dans le cas d'une maladie génétiquement hétérogène :

- A.** Le NGS ne peut être utilisé que pour étudier chaque gène séparément
- B.** L'analyse de l'ensemble des gènes est possible simultanément
- C.** Plusieurs individus peuvent être analysés en même temps
- D.** Parmi les 400 gènes connus de déficience intellectuelle seuls 20 peuvent être analysés par NGS
- E.** Une analyse du transcriptome doit être systématiquement réalisée

QCM 7

Concernant le séquençage de l'exome :

- A.** L'exome correspond à l'ensemble des exons des gènes contenus dans le génome humain
- B.** L'exome correspond à l'ensemble des transcrits du génome humain
- C.** Il s'agit de la technique utilisée couramment pour rechercher des délétions à l'échelle du génome
- D.** Il permet de rechercher des variants dans l'ensemble des exons
- E.** Un filtrage des données est nécessaire pour identifier les variants impliqués dans la maladie chez le patient étudié

QCM 8

Lors du séquençage de l'exome ou de panels de gènes dans le cadre du diagnostic :

- A.** Il est inutile de tenir compte du mode d'hérédité de la maladie pour le filtrage des données

B. Le séquençage est limité au patient lui-même et il est inutile de séquençer d'autres membres de la famille

C. Le filtrage des données repose en partie sur le mode d'hérédité théorique de la maladie

D. Le filtrage des données exclut les variants considérés comme de simples polymorphismes

E. Le filtrage des données tient compte de la pathogénicité prédite des variants

QCM 9

Le séquençage de nouvelle génération :

A. Permet la recherche de variants nucléotidiques au sein du génome

B. Permet la recherche de remaniements génomiques

C. Ne permet pas de séquençer les points de cassure de translocations

D. Permet d'établir le transcriptome d'un échantillon biologique

E. Permet de cartographier les régions chromatinienne présentant des caractéristiques particulières

QCM 10

Concernant la profondeur de lecture du séquençage nouvelle génération :

A. Elle constitue un indicateur de la qualité du séquençage réalisé

B. Elle ne constitue pas un critère utilisé pour valider l'existence de variants

C. Des profondeurs très élevées permettent la recherche d'évènements mutationnels rares dans un échantillon biologique

D. Elle correspond au fait que telle ou telle région d'un gène est couverte lors du séquençage

E. Certaines stratégies de recherche de délétions par NGS reposent sur des mesures de la profondeur de lecture

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 11.3

Utilisation du séquençage de nouvelle génération pour étudier des réarrangements génomiques.

A. Séquençage des points de cassure d'une translocation. Les deux chromosomes impliqués dans la translocation sont indiqués par A (blanc) et B (hachuré). DerA indique le chromosome dérivatif A. La partie basse de la figure schématise le séquençage de la région englobant le point de cassure de la translocation sur le chromosome DerA. Les traits horizontaux représentent des morceaux de séquence de l'ordre de 200 pb. Par alignement de

séquence, chacune des séquences est attribuée au chromosome d'origine (A ou B). Le point de cassure est identifié car le segment séquençé contient pour partie des séquences appartenant au chromosome A et pour partie au chromosome B.

B. Mise en évidence d'une microdélétion. Un segment chromosomique est schématisé en noir. Le segment de 250 kb délété est en blanc. Les traits horizontaux représentent des morceaux de séquence de l'ordre de 200 pb. Par alignement de séquence, chacune des séquences est localisée sur le chromosome de part et d'autre des points de cassure de la délétion. Les points de cassure sont identifiés car le segment séquençé contient pour partie des séquences situées en amont et pour partie des séquences situées en aval des points de cassure.



e-figure 11.4**Immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage de nouvelle génération.**

La chromatine, schématisée par un filament d'ADN sur lequel est liée à certains sites une protéine d'intérêt tel qu'un facteur de transcription (rectangle gris) est isolée à partir d'un échantillon biologique (culture cellulaire, par exemple). Le formaldéhyde est utilisé pour fixer la protéine sur l'ADN dans une étape dite de réticulation. La chromatine est alors soniquée en fragments de taille réduite, puis immunoprécipitée à l'aide de billes recouvertes d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Ceci permet de séparer les billes portant les fragments de chromatine d'intérêt du reste de la chromatine. Après extraction, l'ADN englobé dans la chromatine, ainsi isolée, est purifié, puis séquencé de façon à identifier à l'ensemble des loci génomiques se liant à la protéine d'intérêt.

**e-figure 11.5****Mise à profit de la haute profondeur de lecture du séquençage de nouvelle génération pour identifier des séquences diluées.**

A. Mise en évidence d'une mutation en mosaïque. Une biopsie a été réalisée et comprend du tissu sain (en gris) et du tissu porteur d'une mutation (objectivé en noir). L'ADN extrait de la biopsie provient pour 90 % du tissu sain (filament gris) et pour 10 % du tissu muté (filament noir). L'ADN est séquencé. Chaque molécule porteuse du nucléotide normal (brin gris, boule grise) et du nucléotide muté (brin noir, triangle noir) est identifiée de façon individuelle, ce qui permet d'observer la mutation malgré sa faible représentation (10 %).

B. Analyse d'ADN fœtal dans le sang maternel. L'ADN libre circulant dans le sang maternel a été extrait. Il contient 90 % d'ADN maternel (gris clair) et 10 % d'ADN fœtal (gris foncé). Deux cas de figure sont présentés. Dans le premier cas le fœtus de sexe masculin a un caryotype normal 46,XY. Dans le second cas le fœtus de sexe masculin est porteur d'une trisomie 21 (47,XY). Le séquençage de l'ensemble de l'ADN circulant indique l'existence de deux copies de chacun des autosomes chez le fœtus 46,XY (rapport du nombre de lecture échantillon test / échantillon de référence = 1) et d'une copie supplémentaire du chromosome 21 chez le fœtus 47,XY (rapport = 1,16).



Génétique et pratique médicale

PLAN DE LA PARTIE

Le conseil génétique	147	
Génétique clinique : examen de l'enfant porteur d'anomalies du développement	153	
Hétérogénéité des maladies génétiques	161	
Diagnostic prénatal et préimplantatoire	167	
Dépistage néonatal : éléments à l'usage des cliniciens généticiens	179	
Le diagnostic présymptomatique dans les maladies neurodégénératives héréditaires à début tardif	189	
Dispositions législatives entourant la pratique des tests génétiques	197	
Enjeux éthiques, juridiques et psychologiques en génétique médicale	205	
Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies mitochondriales	211	
Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées		221
Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques		233
Oncogénétique		247
Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique		263
Perspectives thérapeutiques en génétique médicale		273
La pharmacogénétique		285

This page intentionally left blank

Le conseil génétique

David Geneviève, Nicole Philip, Delphine Héron

PLAN DU CHAPITRE

Les principes du conseil génétique	148
Le calcul du risque	149
L'information de la parentèle	150
La perception du risque	151



Points essentiels

Le conseil génétique a plusieurs objectifs :

- apporter des explications concernant la maladie génétique du patient et le lien entre cette maladie et l'altération génétique observée;
- évaluer le risque de survenue ou de récurrence de cette pathologie génétique ou d'une malformation dans la descendance d'un couple ou d'un patient;
- proposer différentes solutions de prévention qui s'offrent aux patients et de les aider dans leurs décisions;
- aider à trouver et organiser les différents spécialistes qui prendront en charge les symptômes de la pathologie génétique.

C'est une démarche médicale originale dans le sens où :

- elle s'adresse le plus souvent à un couple et non à un individu seul;
- elle peut concerner une tierce personne, le fœtus ou l'enfant à venir;
- le plus souvent, aucune solution thérapeutique ne peut être proposée;
- la prévention, lors d'un conseil génétique au cours d'une grossesse, repose sur la possibilité pour le couple de demander un diagnostic prénatal suivi éventuellement d'une interruption de grossesse pour motif médical ou, plus rarement, sur le don de gamètes.

Les principes du conseil génétique

À qui s'adresse le conseil génétique ?

Dans le cadre d'une maladie génétique avec diagnostic clairement établi

- Les couples sollicitent le plus souvent un conseil génétique après la naissance d'un premier enfant atteint d'une malformation ou d'une maladie génétique.
- Parfois, il peut s'agir d'un antécédent familial plus lointain, en particulier dans les maladies liées au chromosome X.
- Dans certains cas, c'est l'un des conjoints, lui-même atteint d'une pathologie, qui souhaite connaître les risques de transmission à sa descendance.
- Le conseil génétique peut s'intégrer dans le cadre d'un diagnostic présymptomatique : il s'agit des maladies génétiques à expression tardive (comme la chorée de Huntington ou les formes familiales de cancer) où le conseil génétique s'adresse à un individu adulte qui souhaite connaître son

statut vis-à-vis de la maladie : cet aspect particulier sera développé dans un autre chapitre.

- Enfin, le conseil génétique peut s'intégrer dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire. Ce type de conseil génétique doit s'intégrer au cours de consultations multidisciplinaires (médecins impliqués dans la procréation médicalement assistée, gynécologues, généticiens cliniciens, généticiens moléculaires ou cytogénéticiens et psychologues) qui évalueront la recevabilité et la faisabilité du diagnostic préimplantatoire.

En cas de suspicion d'une maladie génétique sans diagnostic précis

Le conseil génétique dans ce cas de figure n'est pas aisé car il se fonde sur une probabilité et non des certitudes.

- Pour les couples qui sollicitent un conseil génétique après la naissance d'un premier enfant atteint d'une malformation ou d'une probable maladie génétique mais sans diagnostic clairement établi.
- Un conseil génétique peut être donné en cas de résultat anormal lors du dépistage systématique néonatal, comme pour la mucoviscidose par exemple.
- Un conseil génétique peut également être donné lors d'une grossesse devant la découverte d'un problème inattendu (malformation, nuque anormalement épaisse, excès de liquide amniotique, etc.). Le diagnostic n'est pas encore établi mais il existe une forte suspicion de maladie génétique sous-jacente. Il s'agit d'un cas de figure complexe qui doit faire appel aux compétences multiples des acteurs du centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN).

Quand ?

Idéalement, le conseil génétique doit être donné avant une grossesse, ce qui laisse le temps de préciser le diagnostic, de compléter l'enquête familiale, de réaliser d'éventuels examens complémentaires à visée diagnostique ou, éventuellement, pronostique, et d'accompagner psychologiquement le couple dans sa décision.

Lorsque l'antécédent familial concerne un premier enfant du couple, la chronologie idéale du conseil génétique par rapport à la révélation du handicap est difficile à déterminer : trop précoce, la consultation risque d'être mal acceptée par un couple uniquement préoccupé par l'avenir de l'enfant ; trop retardée, elle risque d'être négligée par le ou les médecins en charge du patient et la famille. Dans ce cas de figure, le conseil génétique est malheureusement encore trop sollicité lorsqu'une nouvelle grossesse est déjà en cours, ce qui complique singulièrement la consultation de conseil génétique.

Parfois, le conseil génétique est donné au cours d'une grossesse devant la découverte de signes identifiés à l'échographie suggérant l'identification d'une pathologie génétique. Le couple, qui n'est pas préparé à la révélation d'une pathologie pour l'enfant à venir, est particulièrement vulnérable et doit être entouré et protégé. Un soutien psychologique est souhaitable.

Qui doit donner le conseil génétique ?

Le recours à un médecin spécialisé en génétique médicale ou à un conseiller en génétique est toujours souhaitable car il est préférable que le praticien chargé d'envisager avec le couple les solutions pour éviter une récurrence du handicap soit différent de celui qui aide quotidiennement ce même couple à assumer la prise en charge de l'enfant malade. Néanmoins, une parfaite connaissance de la pathologie en cause, de son pronostic et des éventuelles perspectives thérapeutiques est indispensable pour donner les informations les plus appropriées et une étroite collaboration entre le médecin traitant et/ou le spécialiste éventuel et le généticien permet d'optimiser le conseil génétique.

Comment ?

Le conseil génétique doit être donné dans un lieu dédié, au calme, avec des informations claires et loyales afin que la ou les personnes recevant ce conseil génétique puissent parfaitement en comprendre les enjeux.

L'aide d'un psychologue en consultation en binôme ou après la consultation avec le généticien est souhaitable afin d'aider le patient ou le couple.

L'enquête génétique constitue la première des étapes du conseil génétique

Cette enquête replace le problème génétique dans son contexte familial. Pour la construction de l'arbre généalogique, il existe des symboles internationaux spécifiques qui doivent être utilisés. Un bon arbre généalogique constitue un véritable dossier permanent de l'information génétique d'une famille qui peut être transmis et interprété sans difficultés. Parfois, cette enquête révèle au clinicien réalisant le conseil génétique des informations concernant des apparentés qui, secret médical oblige, ne peuvent être données aux patients.

Il est indispensable que le généticien puisse être assuré du diagnostic

La confirmation du diagnostic clinique par une analyse biologique génétique (étude chromosomique ou en génétique moléculaire) lorsqu'elle est connue est nécessaire. Elle préparera un éventuel diagnostic prénatal ou préimplantatoire.

- Lorsque le cas index est vivant et que le diagnostic relève de la compétence directe du généticien (syndrome génétique dû à une anomalie du développement), celui-ci peut demander à procéder lui-même à un nouvel examen afin d'orienter les études biologiques génétiques.
- Lorsque la pathologie concerne une autre spécialité, le diagnostic doit être communiqué par un spécialiste informé du fait que sa conclusion servira de base à un conseil génétique.
- Lorsque le lien de parenté entre le/les individu(s) atteint(s) et le couple est plus ou moins lointain (oncle, neveu, cousin, etc.), peut se poser le problème de la confidentialité des informations recueillies par le biais d'un médecin, ou celui de l'examen du dossier médical sans l'accord du patient ou de sa famille. Dans certains cas, le généticien peut ainsi être amené à donner un conseil génétique sans révéler le diagnostic du cas index. Il est parfois nécessaire de demander à un apparenté une autorisation par écrit pour avoir accès à son dossier médical.
- La personne qui donne le conseil génétique doit s'assurer que les informations données ont bien été comprises en particulier concernant le risque de transmission à la descendance de l'affection génétique et la variabilité des symptômes cliniques des pathologies génétiques.
- Enfin, des informations concernant l'existence d'associations de patients doivent être données. La personne donnant le conseil génétique doit évaluer le moment le plus opportun pour donner cette information.

Le calcul du risque

Le risque mendélien est le plus facile à calculer sous réserve d'un diagnostic sans ambiguïté

Il repose sur la détermination exacte du diagnostic ou à défaut sur des arguments généalogiques (récessivité probable en cas de consanguinité, hérédité clairement dominante ou liée au chromosome X). Les détails seront trouvés dans le chapitre consacré à l'hérédité mendélienne (voir [chapitre 4, « Hérédité monogénique et mosaïcisme »](#), mais également [chapitre 5, « Génétique des populations »](#)).

On parle de risque empirique lorsque l'estimation repose sur l'observation de données et non sur un modèle théorique

On utilise ce type d'estimation pour les anomalies chromosomiques et les affections non-mendéliennes dites « multifactorielles » (malformations communes : cardiopathie, fentes labiales, dysraphies du système nerveux central).

Cette situation peut aussi se poser :

- en cas d'hétérogénéité génétique, lorsqu'à une même maladie peuvent correspondre plusieurs modes d'hérédité et que les données généalogiques ne donnent pas d'argument en faveur d'un mode de transmission précis;
- lorsqu'il existe des causes non génétiques de l'affection;
- lors d'un diagnostic prénatal secondaire à l'identification d'un problème inattendu au cours de la grossesse. En effet, lors d'un conseil génétique dans le cadre de ce type de diagnostic prénatal, le diagnostic étiologique précis n'est pas toujours établi. Est alors discutée la probabilité que le fœtus soit atteint d'une pathologie génétique. Par exemple, découverte d'une fente labio-palatine en période anténatale.

Le risque conditionnel

Il consiste à pondérer le risque *a priori* en y intégrant des données généalogiques ou biologiques : par exemple, une femme qui a déjà eu trois garçons normaux a moins de risque qu'une femme qui n'a pas eu d'enfant d'être conductrice pour une maladie liée au chromosome X, même si leurs risques sont *a priori* les mêmes. On utilise pour cela le théorème de Bayes (voir [complément en ligne, «Évaluation du risque en conseil génétique»](#)).

L'information de la parentèle

Une des particularités de la génétique médicale, c'est qu'elle dépasse le niveau individuel pour s'adresser à la famille entière. Les connaissances sur la maladie du « cas index » peuvent avoir un intérêt pour d'autres membres de sa famille à risque de développer ou de transmettre la maladie, surtout dans les maladies liées au chromosome X. Il peut s'agir d'un risque direct sur la santé des individus apparentés lorsqu'il est possible de leur proposer des mesures de prévention ou de soin, comme dans le déficit en OTC, maladie génétique liée au chromosome X dans laquelle un régime hypoprotidique et un traitement permettent d'éviter des crises parfois mortelles.

Mais surtout, la plupart des apparentés ont, quel que soit le diagnostic posé pour le « cas index », la possibilité d'accéder à une information quant au risque de développer ou de transmettre la maladie. Parfois, ils pourront demander, à l'issue du conseil génétique et si le risque est élevé pour leur descendance, de recourir à un diagnostic prénatal ou préimplantaire. Mais, pour pouvoir bénéficier de mesures de soin ou de prévention, encore faut-il avoir été averti de ses antécédents familiaux. Quels sont les devoirs et les responsabilités de chacun des partenaires de la relation de soin, médecin et malade, vis-à-vis de l'information des apparentés à risque ?

Cette difficile question a été abordée dès la première révision des lois de bioéthique, en 2004 et 2011. Dans l'article 1131-1-2 du *Code de la santé publique*, on peut lire :

« Préalablement à la réalisation d'un examen des caractéristiques génétiques d'une personne, le médecin prescripteur informe celle-ci des risques qu'un silence ferait courir aux membres de sa famille potentiellement concernés si une anomalie génétique grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention, y compris de conseil génétique, ou de soins, était diagnostiquée. »

Un arrêté du 8 décembre 2014 définit les règles de bonnes pratiques relatives à la mise en œuvre de l'information de la parentèle et introduit pour la première fois les critères de gravité qui sont « le risque de décès prématuré [et] le risque de handicap sévère en particulier le risque d'impossibilité d'autonomie à l'âge adulte ». Conformément à l'avis du Comité national d'éthique, pour lequel le respect du secret médical reste primordial, l'obligation pour une personne atteinte d'une maladie génétique d'informer son entourage familial n'a pas été inscrite dans la loi. Il est cependant dit que la personne est « tenue d'informer les membres de sa famille potentiellement concernés dont elle ou, le cas échéant, son représentant légal possède ou peut obtenir les coordonnées, dès lors que des mesures de prévention ou de soins peuvent leur être proposées. Si la personne ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille potentiellement concernés, elle peut demander par un document écrit au médecin prescripteur, qui atteste de cette demande, de procéder à cette information. Elle lui communique à cette fin les coordonnées des intéressés dont elle dispose. Le médecin porte alors à leur connaissance l'existence d'une information médicale à caractère familial susceptible de les concerner et les invite à se rendre à une consultation de génétique, sans dévoiler ni le nom de la personne ayant fait l'objet de l'examen, ni l'anomalie génétique, ni les risques qui lui sont associés ».

En réalité, les situations dans lesquelles un patient (ou un couple parent d'un enfant atteint) refuse catégoriquement de transmettre l'information à sa famille sont exceptionnelles.

Elles sont souvent dues à une mauvaise communication et une mauvaise compréhension. Le rôle du médecin ou du conseiller en génétique est essentiel. Il doit tout mettre en œuvre pour obtenir de la personne qu'elle ait compris les enjeux de la démarche proposée et consente à transmettre ou faire transmettre l'information aux membres de sa famille concernés. Cette démarche peut justifier plusieurs entretiens et l'intervention d'un psychologue. Les associations de patients peuvent jouer un grand rôle. Certaines sont impliquées dans la rédaction de documents destinés à l'amélioration de la diffusion de l'information génétique au sein des familles.

La perception du risque

Notion de pourcentage

Que ce risque soit exprimé en pourcentage ou en risque relatif, le couple va traduire cette précision chiffrée en une notion qualitative, celle de risque acceptable ou inacceptable. Tous les médecins ayant une certaine expérience du conseil génétique savent que, dans une situation identique, deux couples n'ont pas la même perception du risque chiffré.

Perception du risque

Au-delà des données chiffrées, nonobstant le niveau intellectuel et culturel des patients, certains facteurs modifient la perception du risque :

- la gravité de la maladie et la façon dont elle est perçue par l'entourage;
- les éventuelles perspectives thérapeutiques et l'espoir que la famille y place;
- le nombre d'enfants sains du couple;
- la possibilité d'un diagnostic prénatal;
- l'expérience personnelle de la maladie (les couples d'hétérozygotes pour une maladie récessive autosomique révélés par un dépistage systématique, comme les hémoglobinopathies dans les populations méditerranéennes ou la maladie de Tay-Sachs chez les juifs ashkénazes, n'ont pas la même attitude que les couples ayant un enfant atteint de la maladie).

Prise de décision

En fonction de ce vécu qui lui est personnel et de sa propre perception du risque, le couple va devoir prendre la décision d'avoir ou non un enfant. Il est alors fréquent que les couples sollicitent une attitude directive de la part du médecin, un vérifiable avis. Or, la personne donnant le conseil génétique se doit de fournir l'information la plus complète et la plus actualisée

possible, sans influencer la décision. Il serait toutefois erroné de résumer son rôle à celui d'informateur passif. Il doit, en relation avec le médecin traitant qui connaît mieux la famille, s'assurer que le conseil génétique a été compris, aider le couple à assumer la révélation du risque et, le cas échéant, proposer des solutions alternatives (don de gamète, adoption). Très souvent, il est utile de répéter les entretiens. Le rôle de la personne donnant le conseil génétique est d'aider l'individu ou le couple à comprendre l'information et à gérer son avenir en fonction des différentes solutions proposées et de son propre vécu.

Le diagnostic prénatal et préimplantatoire

Dans les maladies mendéliennes et les anomalies chromosomiques, l'introduction des techniques de diagnostic prénatal et préimplantatoire a profondément modifié le concept du conseil génétique en permettant aux couples à risque d'avoir les enfants normaux qu'ils peuvent concevoir.

Toutefois, le fait qu'un diagnostic prénatal soit possible ne supprime pas la maladie, ne minimise pas le risque même s'il offre une possibilité diagnostique, le plus souvent de certitude, mais ne permet pas de traiter la maladie. Dans la plupart des cas, le diagnostic prénatal implique d'envisager la possibilité d'une interruption de grossesse pour motif médical en cas d'atteinte fœtale. Le couple doit être dûment informé de cette démarche avant toute grossesse. L'alternative possible au diagnostic prénatal est le diagnostic préimplantatoire. Ce dernier impose néanmoins des contraintes importantes aux couples qui en font la demande.

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre, ils proposent deux textes supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

Conseil génétique : exemple de l'évaluation d'un patient avec une déficience intellectuelle.



Évaluation du risque en conseil génétique.



Bibliographie

- Briard ML, Daplan J, Le Merrer M, et al. Le Conseil génétique. Indications, problèmes et perspectives. Arch Fr Pédiatr 1985; 42 : 151–7.
- Harper PS. Practical Genetic Counselling CRC Press. 7th ed. 2010.
- Kaplan JC, Delpech M. Le diagnostic prénatal par l'analyse de l'ADN. Rev Prat 1987; 37 : 2595–611.

- National Society of Genetic Counselors, Genetic Alliance. Making sense of your genes : a guide to genetic counselling. Washington (DC) : Genetic Alliance; 2008.
- Read AP, Donnai D. What can be offered to couples at (possibly) increased genetic risk? J Community Genet 2012; 3(3) : 167–74.
- Uhlmann WR, Schuette JL, Yashar B. A Guide to genetic counseling. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2009.
- Young ID. Introduction to risk calculation in genetic counseling. 3rd ed. USA : Oxford University Press; 2006.

ENTRAÎNEMENT 12 QCM

QCM 1

Un conseil génétique de certitude peut être fait :

- A.** Pour une maladie génétique dont le gène n'a pas été identifié
- B.** Pour une maladie dont l'origine génétique est incertaine
- C.** Pour une maladie pour laquelle aucune génétique n'a été réalisée et pour laquelle il n'y a pas de cas index dans la famille

- D.** Suite à la naissance d'un enfant ayant une mucoviscidose et pour laquelle il a été montré que chaque parent est hétérozygote
- E.** Pour un couple dont un des parents a une achondroplasie avec mutation génique identifiée

Conseil génétique : exemple de l'évaluation d'un patient avec une déficience intellectuelle

Delphine Héron

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	e2
Définition de la DI	e2
Prévalence de la DI	e2
Étiologies des DI	e2
Intérêt du diagnostic étiologique	e4
Évaluation du diagnostic étiologique	e4
Examens génétiques disponibles pour le bilan étiologique	e7
Autres examens	e7
Stratégie diagnostique	e8
Conclusion	e8

Introduction

La déficience intellectuelle (DI) est une affection fréquente (1 à 2 % de la population), extrêmement hétérogène, à la fois en matière de sévérité (de la déficience légère au polyhandicap) et de comorbidités associées (troubles du comportement, anomalies sensorielles, déficit moteur, pathologies viscérales associées, épilepsie, etc.), mais également sur le plan étiologique avec des centaines de causes différentes (acquises ou génétiques), dont certaines sont extrêmement rares. Le conseil génétique pour une déficience intellectuelle s'appuie sur un diagnostic étiologique de certitude, c'est pourquoi l'essentiel de ce chapitre sera consacré à cette question, après quelques définitions et généralités indispensables à la compréhension du sujet.

Définition de la DI

Avant d'aborder la question du diagnostic étiologique, il est indispensable de préciser la définition de la DI, car la première étape de la démarche sera d'abord celle du diagnostic positif de celle-ci. L'AAIDD (pour American Association on Intellectual and Developmental Disabilities) en 2010 et le DSM-5 en 2013 définissent la déficience intellectuelle par « des limitations significatives du fonctionnement intellectuel et du comportement adaptatif, qui doivent apparaître avant l'âge de 18 ans ». Cette définition signifie donc que le diagnostic de DI ne se limite pas au calcul du quotient intellectuel (QI), mais doit toujours comporter une évaluation du comportement adaptatif dans ses dimensions conceptuelles, sociales et pratiques. Le QI est un score normalisé obéissant à une distribution gaussienne, dont la moyenne est à 100 et la déviation standard à 15. Par définition, le QI est anormalement faible au-delà de $-2DS$, soit un $QI < 70$. Mathématiquement, cette définition impose que 2 à 3 % de la population présentent une DI. Le QI peut être évalué par divers tests d'intelligence générale faisant appel à un ensemble d'aptitudes verbales et non verbales. Lorsque la DI est sévère, on utilise plutôt des échelles de développement. L'évaluation du déficit adaptatif peut se faire grâce à des échelles spécifiques normées et doit impérativement tenir compte de la diversité culturelle et linguistique des sujets et des différences dans leurs modes de communication et leurs comportements. Dans ces évaluations, il est essentiel de prendre en compte non seulement les limitations de la personne, mais également les ressources, et de les explorer dans chaque dimension du fonctionnement qui est évaluée par les tests utilisés (voir ci-dessous).

Dans la littérature, il est fréquemment fait mention d'enfants qui présentent un retard de développement (*developmental delay* [DD]). La différence entre les deux termes DI et DD est essentiellement une question d'âge : le terme DD est habituellement réservé aux jeunes enfants (< 5 ans) qui présentent un décalage dans au moins deux domaines de développement : langage, posture, interaction sociale, motricité fine [1], alors que le terme de « déficience intellectuelle » s'applique habituellement aux enfants plus grands qui ont bénéficié d'un QI [1]. Il faut se souvenir qu'un retard global de développement peut être la manifestation précoce de différents troubles cognitifs ou psychopathologiques, actuellement regroupés dans le DSM-5 sous le terme unique de « troubles du neurodéveloppement », mais que la DI n'est qu'une partie d'entre eux.

Prévalence de la DI

Dans les études récentes, la prévalence estimée de la DI parmi les enfants d'âge scolaire varie entre 1 et 2 %. La prévalence apparente augmente avec l'âge jusqu'à 20 ans. On estime à 1 % la prévalence de la DI dans la population adulte. Les hommes présentent un excès de DI (ratio H/F : 3:2), quelle que soit la sévérité du handicap, sauf dans le groupe de la DI profonde.

Étiologies des DI

Les causes de DI sont multiples [2, 3]. Jusqu'alors, on estimait classiquement que 25 % sont des causes d'origine génétique, 25 % sont acquises (environnementales, etc.) et 50 % indéterminées ou multifactorielles, mais ces fréquences sont en train de changer au profit des causes génétiques du fait de l'évolution des techniques (méthodes de CGH/puces ADN, et plus récemment séquençage à haut débit). La proportion de causes indéterminées, possiblement multifactorielles, augmente lorsque la DI est légère. Ces chiffres restent imprécis, la plupart des séries étant petites et potentiellement biaisées.

Les causes acquises

Les causes acquises représentent environ 25 % des étiologies des DI. On peut les regrouper en fonction de la période de survenue, parmi lesquelles (liste non exhaustive) :

Les causes prénatales

- Embryofoetopathies : CMV, rubéole, toxoplasmose, etc.
- Intoxications : alcool, médicaments, antiépileptiques (valproate), etc.
- Prématuration.
- Pathologies maternelles (dont hypothyroïdie, phénylcétonurie, etc.).

Les causes péri- et post-natales

- Accident périnatal (anoxie cérébrale, hémorragie cérébrale, ictère nucléaire etc.).
- Maladies infectieuses (méningite, encéphalite, etc.).
- Intoxications (saturnisme, etc.).
- Traumatisme crânien.
- Facteurs socioéconomiques (malnutrition, abus, etc.).

Les causes génétiques

Anomalies chromosomiques visibles sur un caryotype (10 % des cas)

Il s'agit d'anomalies de nombre (aneuploïdies) ou de structure (délétions, duplications, dérivés de translocations ou d'inversions, etc.) qui représentent 0,7 % des naissances vivantes. Le rendement diagnostique du caryotype standard dans la DI (avec ou sans malformations associées) varie en fonction de la population étudiée et de la sévérité de la DI (16 % des DI sévères et 5 % des DI légères. Le syndrome de Down (SD ou trisomie 21) est la forme génétique la plus fréquente de DI d'origine génétique. La politique de dépistage prénatal en France a fait passer sa prévalence à la naissance de 1/750 à 1/2 000.

Anomalies chromosomiques infra-cytogénétiques (5 à 7 %)

Il s'agit de remaniements génomiques de petite taille (environ 200 kb), donc non visibles sur un caryotype. Initialement, ils ont été mis en évidence par des techniques de FISH (pour *fluorescence in situ hybridization*) apparues à la fin des années 1980, dont la résolution est donc 20 à 40 fois supérieure à celle du caryotype standard. Contrairement au caryotype, la FISH ne permet pas une analyse pangénomique, mais une étude ciblée sur un locus particulier (correspondant à un syndrome cliniquement identifiable), ou sur l'ensemble des régions subtélomériques (particulièrement riches en gènes du développement). La fréquence des remaniements interstitiels récurrents (microdélétions ou plus rarement microduplications) est de l'ordre de 2 à 3 %, alors

que les remaniements télomériques représentent environ 5 % d'anomalies chromosomiques cryptiques chez des patients présentant une DI syndromique ou non. L'identification de ces microremaniements a permis l'individualisation de syndromes cliniquement reconnaissables (délétions 1p36; 2q37; 3pter; 9q34; 18qter et 22q13, etc.). Depuis l'apparition de l'ACPA (voir ci-dessous), ces techniques ne sont utilisées de première intention que devant une forte suspicion clinique.

Micro-réarrangements génomiques déséquilibrés variés (10 %)

Identifiés par la technique de CGH-array, ou analyse chromosomique sur puce à ADN, (ACPA), d'utilisation assez récente en diagnostic, ils expliquent également environ 10 % des cas de DI. Cette technique a ainsi permis de doubler le nombre d'anomalies chromosomiques décelées chez les patients DI en mettant en évidence des remaniements sub-microscopiques non visibles sur caryotype (appelé CNV, pour *copy number variation*), dont l'interprétation est parfois complexe. Certains de ces CNV sont récurrents et cliniquement reconnaissables. Depuis l'arrivée de l'ACPA, un nombre considérable (et sans doute infini) de remaniements génomiques distincts a été décrit, dont plusieurs centaines ont un phénotype. La majorité de ces syndromes a une prévalence faible, de l'ordre de 1/10 000.

Anomalies monogéniques (autour de 20 % ?)

Elles peuvent être cliniquement identifiables (syndromiques) ou alors responsables d'un tableau de DI non spécifique. On dénombre plus de 1 200 syndromes monogéniques et, actuellement, environ 400 gènes responsables de DI, tous modes de transmission confondus. En dehors des syndromes, les formes monogéniques de DI non spécifique échappaient encore largement au diagnostic, jusqu'à l'arrivée du séquençage haut débit (NGS, pour *next-generation sequencing*) qui est en train de révolutionner l'approche diagnostique, posant néanmoins de vrais problèmes d'interprétation des données générées, et des questions d'ordre éthique (interprétation des variants, résultats non sollicités et résultats secondaires en particulier). Alors que la plupart des gènes identifiés jusqu'alors étaient sur le chromosome X (en raison de l'accès à de grands pedigrees dans lesquels la DI ségrégait selon un mode lié au chromosome X, permettant des études de liaisons), la proportion de gènes récessifs et, surtout, de néomutations dominantes ne cessent de s'accroître [4–6].

Gènes liés à l'X

L'excès de garçons d'environ 40 % dans toutes les études de prévalence et d'incidence de la déficience intellectuelle est pour partie lié au nombre important de gènes responsables de DI sur le chromosome X. Environ une centaine de gènes responsables de DI (syndromique ou non, certains gènes étant d'ailleurs responsables de formes syndromiques et non syndromiques) sont actuellement identifiés sur le chromosome X, et une autre centaine pourrait être encore à identifier. Le plus connu et le plus fréquent des gènes responsables de DI sur le chromosome X est le gène *FRAXA*, responsable du syndrome de l'X fragile, bien que la prévalence de l'ensemble des autres gènes de l'X impliqués dans la déficience intellectuelle soit supérieure au syndrome de l'X fragile seul. Néanmoins, le syndrome de l'X fragile est le plus fréquent des DI héréditaires (environ 1/4 000 à 1/5 000 garçon et 1/8 000 fille). Sa fréquence (présence d'une mutation complète) dans la population des personnes DI est estimée à 2 à 3 % chez les garçons et de 1 à 2 % chez les filles (voir chapitre 29, « Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie d'instabilité : le syndrome de l'X fragile »).

Gènes autosomiques (dominants et récessifs)

Depuis l'apparition des nouvelles techniques de NGS (*whole-exome sequencing* [WES]), de très nombreux nouveaux gènes responsables de formes autosomiques récessives ou dominantes (dans ce cas, il s'agit le plus souvent de néomutations) de DI ont été identifiés [4–6]. Parmi ceux-ci, certains sont indifféremment responsables de formes syndromiques ou non syndromiques. Certains de ces nouveaux gènes semblent avoir un phénotype associé, en cours de description. Les études (de plus en plus nombreuses) de NGS pour le diagnostic de la DI, par séquençage d'exome ou panels de gènes, montrent un taux de diagnostic autour de 20 %. Comme observé dans le cas des formes liées au chromosome X, les résultats obtenus attestent de l'extrême hétérogénéité génétique de ces anomalies et du très petit nombre de patients avec des mutations d'un même gène. Parmi les formes autosomiques récessives de DI, il faut penser aux erreurs innées du métabolisme dont certaines se manifestent par une DI non spécifique (phénylcétonurie, déficit en créatine, défaut de synthèse des purines, acidurie 4-hydroxybutyrique).

Mode de transmission non mendélien

Certains syndromes associés à une DI sont de transmission non mendélienne, les plus connus sont les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, résultant d'anomalies d'empreinte [7, 8].

Intérêt du diagnostic étiologique

En l'absence de traitement curatif dans la DI, plusieurs facteurs justifient l'intérêt du diagnostic étiologique le plus précocement possible, parmi lesquels : répondre à la question du « pourquoi » et nommer la maladie, préciser le pronostic et la trajectoire développementale, en particulier lorsque l'enfant est petit (même s'il est important de souligner qu'il peut exister une grande variabilité pour un même diagnostic étiologique), mettre en place un suivi médical approprié, adapter la prise en charge socioéducative, accéder aux protocoles thérapeutiques, etc.

Pour le généticien, un intérêt essentiel du diagnostic étiologique est de permettre un conseil génétique fiable pour le couple des parents et l'ensemble de la famille et d'évaluer le risque de récurrence. En effet, celui-ci n'est possible de façon fiable que si on a la certitude du diagnostic étiologique. Sinon, on reste dans des probabilités généralistes qui ont peu d'intérêt pour les couples concernés. Pouvoir mettre en évidence qu'une anomalie génétique est accidentelle (et non héréditaire) permet le plus souvent de rassurer, en gardant néanmoins à l'esprit le risque de mosaïque germinale. À l'inverse, montrer qu'il s'agit d'une anomalie transmise (un gène sur le chromosome X, un gène récessif ou, plus rarement, un gène dominant à expression variable ou pénétrance incomplète) peut permettre au couple de prendre des décisions, en particulier celle de recourir à un diagnostic prénatal et, le cas échéant, à une interruption médicale de grossesse ou, possiblement, à un diagnostic préimplantatoire. Dans la famille élargie, le diagnostic étiologique de certitude va permettre d'identifier les personnes à risque et de pouvoir proposer un dépistage des hétérozygotes, ou des femmes transmettrices dans la DILX, puis potentiellement un conseil prénatal et/ou un diagnostic prénatal aux couples à risque.

Évaluation du diagnostic étiologique

Du fait du très grand nombre de gènes impliqués dans la DI (plusieurs centaines), de leur faible récurrence (moins de 1 %), du caractère *de novo* de la majorité d'entre eux et de la multiplicité des voies physiopathologiques impliquées, le choix des stratégies diagnostiques est complexe, en particulier dans la DI isolée. Le diagnostic étiologique n'aboutit d'ailleurs pas toujours. Actuellement, malgré les progrès technologiques, l'absence de cause identifiée reste importante, surtout dans la DI légère (50 à 65 %).

Étape clinique

C'est pourquoi, même avec l'avènement des techniques de NGS pouvant laisser penser que le phénotype clinique n'a plus d'importance ou est secondaire, il reste fondamental d'adopter une démarche systématisée débutant par l'étape clinique. Dans un grand nombre de cas, un « regard croisé » associant neuropédiatre, généticien clinicien et parfois pédopsychiatre est nécessaire. L'étape clinique peut permettre de poser d'emblée une hypothèse diagnostique, en particulier s'il existe des signes associés (formes syndromiques). Si l'orientation se fait ensuite vers le NGS (panel ciblé ou exome), l'identification de variants rendra dans la majorité des cas un retour nécessaire à la clinique pour leur interprétation.

La consultation médicale initiale comporte plusieurs étapes.

Antécédents familiaux

La réalisation de l'arbre généalogique est un temps important de la consultation, permettant éventuellement de s'orienter vers un mode de transmission préférentiel. Le temps nécessaire doit être consacré au recueil des antécédents familiaux, en insistant sur les antécédents de DI, d'épilepsie, de troubles psychiatriques ou psychologiques, mais également de malformations. Il est indispensable de reconstituer l'histoire familiale sur trois générations : le patient et sa fratrie, ses parents et leurs fratries, les enfants des oncles et tantes, les grands-parents (et, si possible leur fratrie et leur descendance). L'âge des parents sera noté : un âge maternel élevé pouvant orienter vers une pathologie chromosomique, tandis qu'un âge paternel élevé oriente davantage vers une mutation *de novo* dans le cadre d'une pathologie autosomique dominante.

Dans certains cas, il est possible d'évoquer un mode de transmission. Par exemple, l'existence, dans la branche maternelle, de plusieurs sujets masculins (frères, oncles) présentant des troubles cognitifs permet de poser l'hypothèse d'une déficience intellectuelle dont le gène responsable est situé sur le chromosome X (RMLX). Un lien de parenté entre les parents peut orienter vers une pathologie autosomique récessive (mais sans certitude). Dans les affections dominantes, la variabilité d'expression peut rendre certains signes inconstants et c'est en combinant les signes présentés par différents membres d'une même famille que l'on peut arriver à compléter un cadre syndromique. C'est le cas par exemple de la maladie de Steinert, de la microdélétion 22q11, des mutations du gène PTEN, etc.

À l'inverse, des tableaux cliniques de DI sans rapport les uns avec les autres dans une même famille, des fausses couches à répétition ou des décès néonataux suggèrent une anomalie chromosomique déséquilibrée; une translocation équilibrée familiale pouvant engendrer des phénotypes différents en rapport avec des remaniements déséquilibrés différents.

Il faut s'inquiéter de la survenue de fausses couches, de morts fœtales, et même de décès dans la fratrie du patient, car cette information n'est pas forcément donnée spontanément. Un handicap touchant tous les enfants d'une fratrie doit faire évoquer une cause maternelle toxique (alcool) ou métabolique (phénylcétonurie, en particulier chez une femme née à l'étranger, ou avant 1975). Parmi les causes environnementales de retard et de troubles comportementaux, il ne faut pas négliger l'intoxication chronique au plomb, fréquente dans certains environnements insalubres.

Antécédents personnels du patient

Les antécédents personnels du patient depuis la conception jusqu'au moment de la consultation doivent être recueillis, en particulier les éléments suivants :

- circonstances de la conception (naturelle ou médicalisée), antécédents d'hypofertilité;
- suivi de la grossesse (sérologies, exposition à l'alcool, prises médicamenteuses, mouvements actifs, échographies, etc.);
- conditions de naissance (Apgar, adaptation à la vie extra-utérine, etc.);
- mensurations de naissance (poids, taille et périmètre crânien [PC]);
- période néonatale (modalités d'alimentation, courbe de poids, séjour en néonatalogie ou réanimation, etc.);
- chronologie des acquisitions psychomotrices : tenue de tête, station assise, debout, âge de la marche, des premiers mots, des premières associations de mots, de la propreté, etc.;
- existence de troubles comportementaux (sommeil, angoisse, tolérance aux changements, communication, sociabilité, etc.);
- parcours scolaire (redoublements, orientations, AVS/EVS, etc.);
- rééducations mises en place et leur chronologie (orthophonie, psychomotricité, soutien psychologique, etc.);
- histoire médicale, courbes de croissance (staturale et pondérale, et du PC), éventuelles malformations mineures ou majeures, opérées ou non (cœur, reins, extrémités, OGE, etc.);

• dans le contexte de DD/DI, on s'intéressera particulièrement :

- à rechercher des épisodes aigus inhabituels (intolérance au jeûne, aux infections, régime alimentaire sélectif), qui peuvent orienter vers une pathologie métabolique,
- à l'existence de convulsions dont il faut définir le type et la chronologie, le caractère fébrile ou non, le(s) traitement(s), le caractère pharmaco-résistant éventuel, etc.;
- à préciser l'histoire des signes neurologiques et leur caractère fixe, progressif, ou intermittent (ce dernier signe pouvant être évocateur d'une maladie métabolique),
- au phénotype comportemental : hyperactivité sévère, comportement autistique, rires inappropriés et absence de langage, troubles du comportement alimentaire, automutilation, stéréotypies, hyperréactivité au bruit, etc.;
- à la présence de troubles sensoriels ou de malformations mineures qu'il faut savoir rechercher.

Il faut noter que l'anamnèse peut être complexe chez l'adulte, surtout si les parents ne sont plus présents. On s'aidera dans tous les cas, si possible, du carnet de santé et de tous les documents médicaux disponibles.

Examen clinique

Celui-ci est général et complet, en insistant sur l'examen morphologique et neurologique. Les mensurations seront notées et les courbes de croissance faites (poids, taille et PC). Lorsqu'il existe une anomalie du PC, ne pas oublier de mesurer le PC parental, compte tenu de l'existence d'une corrélation entre le PC des parents et celui de leurs enfants. En fonction du contexte clinique et de l'âge, l'avis du généticien, du neuropédiatre ou neurologue, voire du pédopsychiatre (ou psychiatre) sera sollicité. L'avis d'un généticien clinicien est toujours souhaitable, lorsqu'il existe une dysmorphie, et devient indispensable lorsqu'il existe des malformations, une dysmorphie ou qu'il existe des antécédents familiaux.

L'examen morphologique vise à détecter des anomalies même mineures susceptibles d'orienter vers une étiologie. On recherche la présence d'une dysmorphie (anomalie de la face, des oreilles, du palais, des dents, etc.), une déformation du thorax ou du rachis (pectus, mamelons accessoires, scoliose), des anomalies cutanées (pigmentation anormale, malformations vasculaires), des anomalies des extrémités (hyperlaxité, malformations mineures, pieds bots, etc.), des phanères, des OGE, etc.

Examen neurologique

L'examen neurologique vise à détecter des signes neurologiques permettant d'orienter vers une étiologie. Il recherche des anomalies motrices, sensorielles, des signes

pyramidaux, extrapyramidaux, cérébelleux, dystoniques, etc., une hypotonie globale ou segmentaire, des mouvements anormaux, etc.

Le phénotype comportemental peut également orienter le diagnostic : hyperactivité sévère, comportement autistique, rires inappropriés, polyphagie, automutilation, stéréotypies, hyperréactivité au bruit, tachypnée intermittente, etc.

Bilan sensoriel

- Une surdité doit impérativement être recherchée devant un retard de langage ou des difficultés orthophoniques importantes.
- L'examen ophtalmologique est également indispensable pour tout enfant DD/DI, d'une part pour vérifier la vision et la corriger le cas échéant, d'autre part dans le cadre d'un bilan malformatif à la recherche de malformations, d'un glaucome, de mouvements anormaux, d'une rétinopathie ou d'une atrophie optique. Il doit impérativement comprendre un fond d'œil et un examen à la lampe à fente.

Psychométrie

Tout enfant DD/DI doit pouvoir bénéficier d'examens psychométriques par des tests standardisés adaptés. Le WISC IV est le test cognitif le plus universellement utilisé chez l'enfant. Il permet de calculer un QI total et quatre indices composites (compréhension verbale, raisonnement perceptif, mémoire de travail, vitesse de traitement), qui ont été substitués aux QI verbal et QI de performance du WISC III. Les tests passés par l'enfant peuvent être difficiles à mettre en œuvre lorsque l'il est peu collaborant, en raison de son anxiété ou de son niveau de compréhension, ou lorsqu'il présente une fatigabilité ou un déficit d'attention (THADA, absences, médicaments, etc.). L'évaluation du QI doit être complétée par des échelles d'adaptation, qui évaluent l'autonomie, le comportement et les capacités à s'adapter aux contraintes imposées par l'environnement. Ce type d'évaluation se présente souvent sous forme de questionnaire semi-directif soumis aux parents. L'échelle de Vineland est un test indirect (enquêtes auprès des proches) évaluant quatre domaines (communication, capacités adaptatives dans la vie courante, socialisation et capacités motrices). Elle permet d'apprécier les capacités adaptatives et de suivre leur évolution ou la pertinence et l'efficacité des projets éducatifs. Des évaluations complémentaires du langage réceptif et expressif (bilan orthophonique) peuvent compléter l'évaluation. Une observation psychopathologique, en centre médicopsychologique (CMP), centre d'action médicosociale précoce (CAMSP) ou en centre de ressources autisme (CRA) pourra être

nécessaire pour analyser les troubles du comportement fréquemment associés à la déficience intellectuelle, en particulier les troubles du spectre autistique.

Examens génétiques disponibles pour le bilan étiologique

Les étapes précédentes permettent dans un certain nombre de cas de soupçonner une étiologie particulière, qui orientera les examens ultérieurs. Mais, le plus souvent, l'étape clinique ne permet pas d'évoquer une étiologie particulière. Jusqu'en 2007, un caryotype standard et l'étude des télomères selon les critères de De Vries étaient le *gold standard* des examens génétiques dans la DI. L'avènement des nouvelles technologies (ACPA et NGS) est en train de modifier cette approche.

- L'ACPA a remplacé le caryotype et l'étude des télomères à la recherche de remaniements déséquilibrés (même si seules les techniques de cytogénétique conventionnelle et de FISH permettent d'identifier un remaniement équilibré ou de localiser la position d'un segment dupliqué).
- La FISH garde toute sa place pour la confirmation d'un diagnostic de syndrome microdélétionnel cliniquement suspecté et pour la confirmation des anomalies mises en évidence en ACPA.
- L'avènement du NGS, qui va devenir un outil majeur pour le diagnostic des DI, va fondamentalement modifier l'approche du diagnostic étiologique chez les patients déficients intellectuels qui vont alors pouvoir bénéficier d'emblée de l'étude de plus de 300 gènes de DI (quelle que soit la technique utilisée, WES ou « panel » de gènes ciblés). Il est capital de garder à l'esprit que, même à partir d'un panel de gènes connus, l'interprétation des données pose des difficultés à la fois techniques (déterminer le variant causal) et éthiques (résultats non sollicités).
- La place des études ciblées de gènes connus par les techniques classiques (Sanger) de première intention (vs panels ou exome) est en discussion, mais reste d'actualité pour la confirmation des variants.

Autres examens

Bilan métabolique

L'intérêt et la particularité du dépistage des maladies métaboliques comme cause de DI est leur caractère potentiellement traitable, surtout lorsqu'elles sont identifiées

précocement. Néanmoins, sans point d'appel clinique, la probabilité d'identifier une étiologie par le bilan métabolique est très faible, en particulier en France, pays qui bénéficie d'un dépistage néonatal systématique de la phénylcétonurie (contrairement à d'autres pays d'Europe et de nombreux pays d'Asie ou d'Afrique). Il n'y a aujourd'hui pas de consensus pour la place de ces examens dans le diagnostic étiologique d'une DI, sauf s'il existe des signes d'appel évocateurs (notion d'intervalle libre et de régression, signes neurologiques, surcharge, etc.). Il faut noter que certaines maladies métaboliques se manifestent par une DI fixée, sans autre signe d'appel, et que celles-ci peuvent être recherchées.

Bilan malformatif

Un bilan malformatif s'impose lorsqu'il existe une ou plusieurs malformations (même mineures) ou une dysmorphie. Les malformations viscérales (cœur et reins) seront recherchées par des échographies systématiques, parfois en orientant la demande en cas de suspicion clinique. Ce bilan malformatif pourra être complété par des radiographies du squelette, un examen ophtalmologique (FO et à la LAF, etc.).

Imagerie cérébrale

Il n'y a pas de consensus dans la littérature médicale pour la place de l'imagerie cérébrale dans la DI, que ce soit le scanner ou l'IRM. Au total, l'imagerie cérébrale par résonance magnétique met en évidence une anomalie dans environ 30 % des cas. Toutefois, les anomalies observées ne fournissent la clé du diagnostic étiologique que dans un tout petit nombre de cas (2 à 4 %). Une IRM est indiquée en cas de macro- ou de microcéphalie, en cas d'épilepsie ou de régression, de signes neurologiques, en cas de retard sévère avec retard moteur (marche non acquise à deux ans) [9]. Lorsqu'une IRM est réalisée, il est souhaitable de la compléter systématiquement par une séquence de spectroscopie IRM, qui détectera les anomalies du métabolisme de la créatine ou des lactates. Un CT-scan peut compléter l'IRM, essentiellement pour la recherche de calcifications en cas de microcéphalie ou d'anomalie de la substance blanche.

Biologie générale

L'intérêt d'un bilan biologique général est double : orienter le diagnostic étiologique et dépister des anomalies plus fréquentes chez les patients DI.

Stratégie diagnostique

L'objectif principal d'un diagnostic étiologique reste avant tout la recherche d'une cause curable de déficience et/ou d'une cause possiblement récurrente impliquant un conseil génétique fiable. Le choix des examens et leur rapidité de mise en œuvre prendront en compte le souhait de la famille et la notion d'une grossesse en cours.

Le principe de la gradation des investigations paraît raisonnable. De nouvelles recommandations sont en train d'émerger. Mais la stratégie diagnostique dépend également des possibilités locales et est appelée à être modifiée en cette période d'évolutions technologiques [10].

Conclusion

La DI est une affection fréquente (une personne sur 40 environ), dont les causes sont multiples. Les causes génétiques sont les plus fréquentes et le nombre d'anomalies identifiées ne cesse de croître (plusieurs centaines) avec l'évolution des techniques en génétique, en particulier l'arrivée du séquençage haut débit en diagnostic. La démarche diagnostique n'est pas toujours aisée. Avec les outils disponibles, une anomalie du développement ou une cause génétique (ou génomique) est retrouvée dans 50 % des cas environ. En l'absence de diagnostic, une réévaluation régulière est indispensable. En effet, en l'absence de diagnostic

biologique précis, il est impossible de donner un conseil génétique fiable et de proposer un diagnostic prénatal.

Références

- [1] Shevell M. Global developmental delay and mental retardation or intellectual disability : conceptualization, evaluation, and etiology. *Pediatr Clin North Am* 2008 ; 55(5) : 1071–84.
- [2] Moeschler JB. Genetic evaluation of intellectual disabilities. *Semin Pediatr Neurol* 2008 ; 15(1) : 2–9.
- [3] Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 2006 ; 117(6) : 2304–16.
- [4] Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 2011 ; 478(7367) : 57–63.
- [5] de Ligt J, Willemsen M.H, van Bon B.W, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012 ; 367(20) : 1921–9.
- [6] Athanasakis E, Licastro D, Faletra F, et al. Next generation sequencing in nonsyndromic intellectual disability : from a negative molecular karyotype to a possible causative mutation detection. *Am J Med Genet A* 2014 ; 164A(1) : 170–6.
- [7] Chamberlain SJ, Lalande M. Angelman syndrome, a genomic imprinting disorder of the brain. *J Neurosci* 2010 ; 30(30) : 9958–63.
- [8] Gurrieri F, Accadia M. Genetic imprinting : the paradigm of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Endocr Dev* 2009 ; 14 : 20–8.
- [9] Decobert F, Grabar S, Merzoug V, et al. Unexplained mental retardation : is brain MRI useful? *Pediatr Radiol* 2005 ; 35(6) : 587–96.
- [10] Verloes A, Héron D, Billette de Villemeur T, et al. Diagnostic investigations for an unexplained developmental disability. *Arch Pediatr* 2012 ; 19(2) : 194–207.

<https://www.univers-medecine.com>

Évaluation du risque en conseil génétique

Nicole Philip

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	e10
Le risque a priori dans les maladies monogéniques	e10
Ajustement du calcul de risque : probabilités bayésiennes	e11

Introduction

Le terme de risque génétique définit la probabilité pour un individu d'être porteur d'une mutation spécifique à l'origine d'une maladie génétique ou celle d'être atteint par cette maladie. L'évaluation de ce risque est un élément essentiel du conseil génétique. Le risque a priori, déduit de l'application de la génétique mendélienne à une famille particulière, des données de la génétique des populations ou de certaines données empiriques, peut être modulé par l'existence d'informations supplémentaires tirées de l'observation de la famille ou des données de tests génétiques.

Le risque a priori dans les maladies monogéniques

Maladies autosomiques dominantes

L'enfant d'un individu atteint d'une maladie dominante autosomique a 50 % de risque d'être lui-même porteur de la mutation.

En présence d'un cas sporadique lié à une mutation de novo, il faut tenir compte de la possibilité d'une mosaïque germinale. Comme il n'est pas possible de prédire l'existence de cette mosaïque ni d'en apprécier la gravité, on donne une estimation empirique de 2 à 5 % de risque de récurrence pour un futur enfant.

Maladies autosomiques récessives

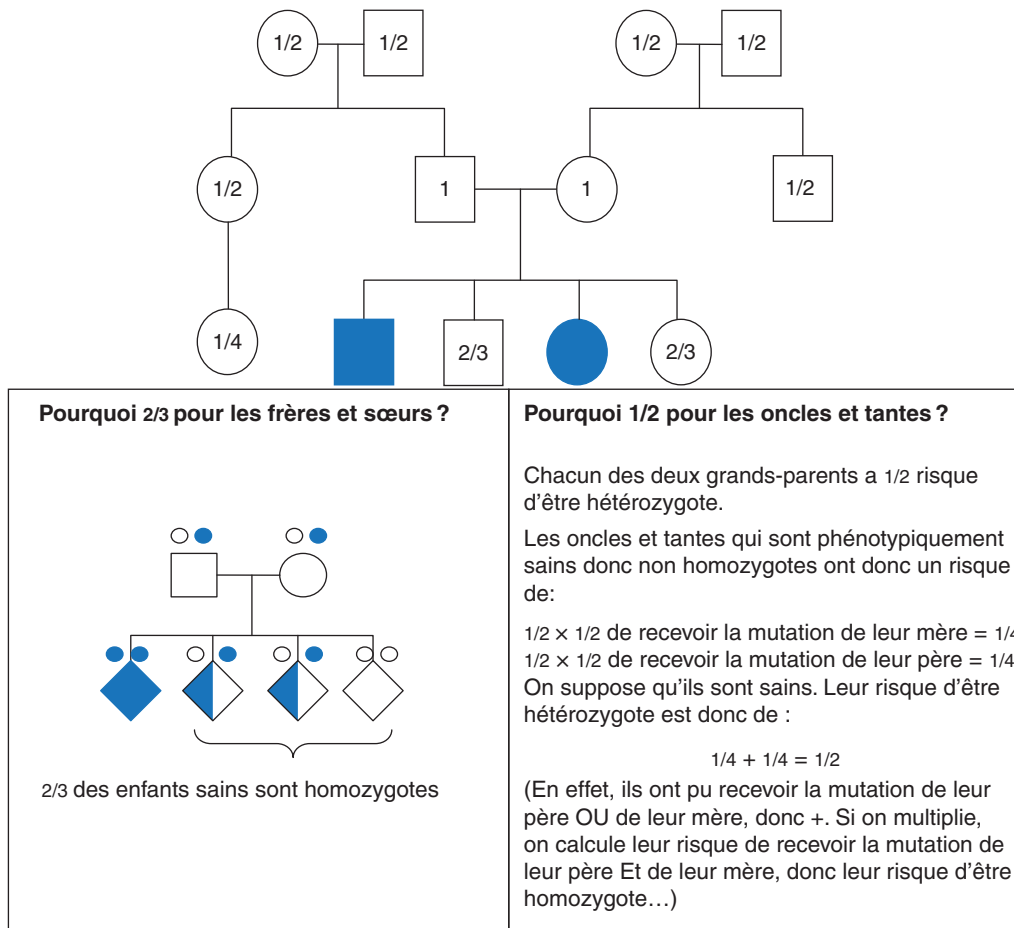
Le risque pour un couple d'avoir un enfant atteint d'une maladie récessive autosomique est égal à :

Risque que la mère soit hétérozygote X Risque que le père soit hétérozygote X 1/4

Explication de 1/4 : un risque sur deux que l'allèle issu de la mère hétérozygote soit muté ET un risque sur deux que l'allèle hérité du père hétérozygote soit muté : $1/2 \times 1/2 = 1/4$

La probabilité qu'un individu soit hétérozygote pour une mutation dans un gène donné dépend de l'existence ou non d'un antécédent familial.

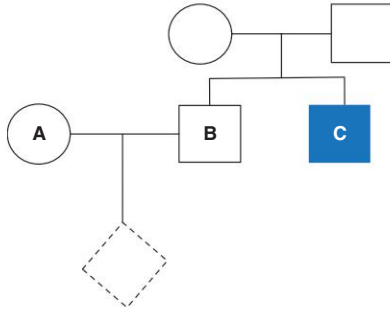
Lorsque l'individu est apparenté à un individu atteint (homozygote) d'une maladie récessive ou hétérozygote, son risque d'être porteur d'une mutation à l'état hétérozygote dépend du lien de parenté avec l'individu atteint.



En l'absence d'histoire familiale, on considère qu'un individu est représentatif de la population générale. La probabilité d'être hétérozygote pour une mutation dans un gène particulier peut être calculée à partir de la fréquence de la maladie en utilisant la loi de Hardy-Weinberg ($2pq \sim 2\sqrt{q^2}$).

Exemple 1

Quel risque a le couple de Madame A et de Monsieur B d'avoir un enfant atteint mucoviscidose, maladie récessive qui atteint un individu sur 25 000 dans la population générale et dont est atteint l'individu C, frère de Monsieur B ?



Risque que Monsieur B soit hétérozygote : $2/3$ puisque c'est le frère d'un individu malade homozygote.

Risque que Monsieur B transmette l'allèle muté s'il est hétérozygote : $1/2$

Risque que Madame A soit hétérozygote :

$$2pq \sim 2\sqrt{q^2} = 2\sqrt{1/2500} = 2 \times 1/50 = 1/25$$

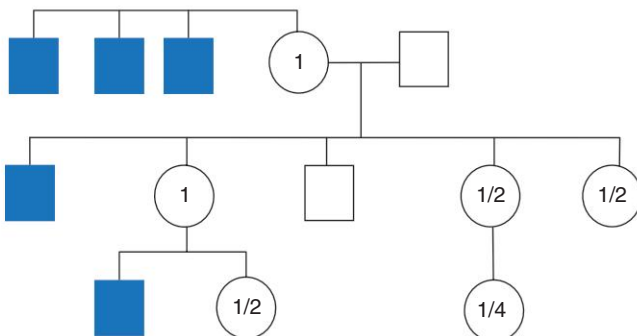
Risque que Madame A transmette l'allèle muté s'il est hétérozygote : $1/2$

$$\text{Risque que l'enfant soit atteint} = 2/3 \times 1/25 \times 1/2 \times 1/2 = 2/3 \times 1/25 \times 1/4 = 1/150$$

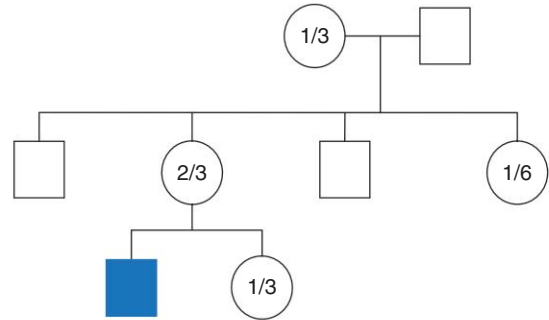
Maladies liées au chromosome X

Le risque d'être hétérozygote pour un individu de sexe féminin dépend de son lien de parenté avec le ou les individus atteints et de l'histoire familiale.

En cas d'affection familiale prouvée (atteinte de plusieurs générations), les filles d'une femme conductrice obligatoire ont $1/2$ risque d'être elles-mêmes hétérozygote. Le risque d'une fille est égal à la moitié du risque de sa mère.



En l'absence d'histoire familiale, il n'est pas possible d'exclure une mutation *de novo*. Pour une maladie génétiquement létale (comme la dystrophie musculaire de Duchenne), la probabilité pour la mère d'un cas sporadique d'être hétérozygote est de $2/3$.



Ajustement du calcul de risque : probabilités bayésiennes

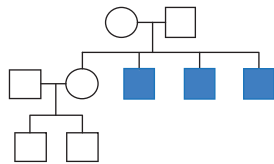
Décrit au XVIII^e siècle par le révérend Thomas Bayes sous le nom de théorie des probabilités (*doctrine of chances*), le théorème qui porte son nom est utilisé pour affiner l'estimation d'une probabilité à partir d'observations et des probabilités de ces observations. Ces « observations » peuvent être des données tirées de l'arbre généalogique, des connaissances sur l'histoire naturelle de la maladie (pénétrance liée à l'âge) ou des résultats d'examen biologiques, notamment de génétique moléculaire.

Il est largement utilisé pour calculer le risque génétique.

On construit quatre niveaux de probabilités

- Probabilités a priori. Soit deux hypothèses mutuellement exclusives A et $\bar{A}$ (non A). Un individu est soit A, soit $\bar{A}$. Les probabilités de chacune de ces hypothèses, sont les probabilités a priori.
- Probabilité conditionnelle. Soit un événement B dont la probabilité est dépendante de chacune des hypothèses : probabilité de B si A ou probabilité de B si $\bar{A}$.
- Probabilité conjointe de chaque hypothèse. Probabilité de A et B ($PA \times B$ si A) ou probabilité de $\bar{A}$ et B ($P\bar{A} \times B$ si $\bar{A}$).
- Probabilité a posteriori de chacune des hypothèses de départ en tenant compte de l'événement : probabilité de A si B ou de $\bar{A}$ si B. La probabilité a posteriori de chacune des hypothèses est égale à la probabilité conjointe de cette hypothèse divisée la somme des probabilités conjointes des deux hypothèses : $P A \text{ si } B = P B \text{ si } A / P B \text{ si } A + P B \text{ si } \bar{A}$.

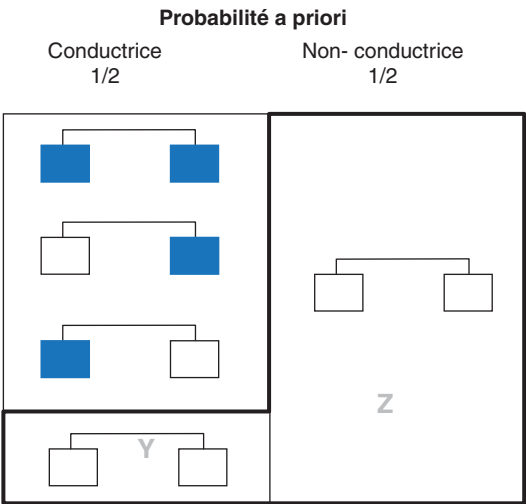
Premier exemple : estimation du risque d'hétérozygotie pour une maladie liée à l'X



Madame X a trois frères atteints d'une dystrophie musculaire de Duchenne, maladie récessive liée au chromosome X. Les antécédents familiaux démontrent que sa mère est obligatoirement hétérozygote. Madame A a donc une probabilité a priori de 50 % (1/2) de porter elle-même la mutation à l'état hétérozygote.

Madame X a deux garçons sains. Ceci modifie-t-il son risque?

On peut considérer que le fait d'avoir deux garçons sains est une « observation » ou un « événement » qui peut modifier la détermination du risque.



Hypothèse	Conductrice	
Probabilité a priori	1/2	1/2
Probabilité conditionnelle (avoir 2 garçons sains)	1/2 X 1/2 = 1/4	1
Probabilité jointe	1/8	1/2
Probabilité a posteriori	1/8 / 1/8 + 1/2 = 1/5	1/2 / 1/2 + 1/8 = 4/5

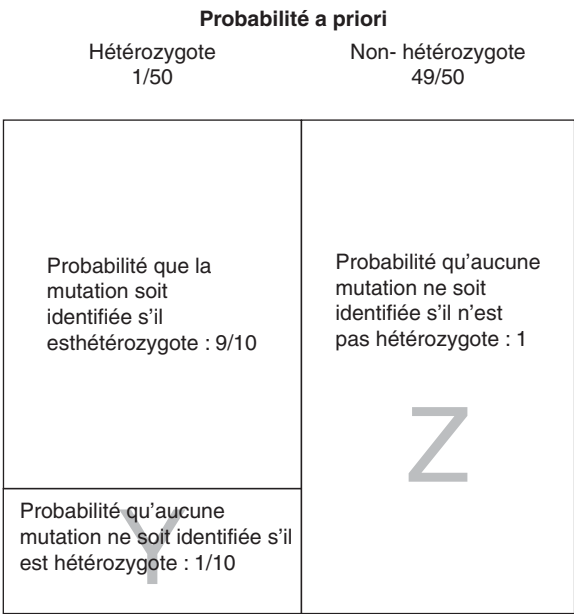
- Probabilités a priori :
- d'être conductrice : 1/2 (PA)
 - de ne pas être conductrice : 1/2 (P $\bar{A}$)

- Probabilités conditionnelles :
- probabilité d'avoir deux enfants sains si elle est conductrice : $1/2 \times 1/2 = 1/4$ (P B si A)
 - probabilité d'avoir deux enfants sains si elle n'est pas conductrice : 1 (P B si $\bar{A}$)

- Probabilité conjointe :
- probabilité d'être conductrice ET d'avoir deux enfants sains : (probabilité d'appartenir à l'espace Y) = PA X P B si A = $1/2 \times 1/4 = 1/8$
 - probabilité de ne pas être conductrice ET d'avoir deux enfants sains : (probabilité d'appartenir à l'espace Z) = P $\bar{A}$ X P B si $\bar{A} = 1/2 \times 1 = 1/2$

- Probabilité a posteriori :
- Probabilité d'être conductrice si elle a deux enfants sains :

$$\frac{Y}{Y+Z} = \frac{1/8}{1/8+1/2} = 1/5$$



Deuxième exemple : analyse bayésienne utilisant les résultats des analyses moléculaires

Soit une maladie récessive qui atteint un enfant sur 10 000. La probabilité d'être hétérozygote dans la population générale est donc de 1/50. Il existe une hétérogénéité génétique allélique. On utilise une méthode qui permet d'identifier 90 % des mutations.

Quelle est la probabilité pour un homme issu de la population générale d'être hétérozygote alors que la recherche de mutations est négative chez lui ?

Probabilités a priori :

- d'être hétérozygote : $1/2$ (PA) : $1/50$
- de ne pas être hétérozygote : $1/2$ (P $\bar{A}$) : $49/50$

Probabilités conditionnelles :

- probabilité qu'aucune mutation ne soit identifiée s'il est hétérozygote : (P B si A) : $1/10$
- probabilité qu'aucune mutation ne soit identifiée s'il n'est pas hétérozygote : 1 (P B si $\bar{A}$) : 1

Probabilité conjointe :

- probabilité d'être hétérozygote ET de n'avoir aucune mutation identifiée : (probabilité d'appartenir à l'espace Y) = PA X P B si A = $1/50 \times 1/10 = 1/500$

- probabilité de ne pas être hétérozygote ET de n'avoir aucune mutation identifiée : (probabilité d'appartenir à l'espace Z) = P $\bar{A}$ X P B si $\bar{A}$ = $49/50 \times 1 = 49/50$

Probabilité a posteriori :

Probabilité d'être hétérozygote si aucune mutation identifiée :

$$\frac{Y}{Y+Z} = \frac{1/500}{1/500 + 49/50} = 1/491$$

Bibliographie

Ogino S, Wilson RB. Bayesian analysis and risk assessment in genetic counseling and testing. J Mol Diagn 2004; 6(1) : 1–9.

Génétique clinique : examen de l'enfant porteur d'anomalies du développement

Didier Lacombe, Nicole Philip

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	154
Les données de l'interrogatoire	154
Examen clinique	154
Les données de l'imagerie	158
Conclusion	158



L'essentiel à retenir

Les données de l'examen dysmorphologique d'un enfant doivent être intégrées à son histoire familiale par la construction d'un arbre généalogique; et à son histoire personnelle, incluant son développement psychomoteur, son parcours médico-chirurgical. La dysmorphie ne doit être un motif de consultation et d'explorations que si elle s'intègre dans un contexte malformatif ou de déficience intellectuelle. Une ressemblance familiale éventuelle doit être interprétée avec précaution et peut être le témoin d'une pathologie génétique dominante à expressivité variable.

La description précise de l'enfant et surtout la prise de photographies font partie intégrante de l'examen en dysmorphologie, mais peuvent questionner les parents. Il est indispensable de leur en expliquer la raison.

L'examen clinique doit toujours être complet sur un enfant déshabillé.

L'examen de la face et des extrémités permet de recueillir les éléments les plus informatifs.

Les examens complémentaires sont guidés par l'approche clinique.

dysmorphologie peuvent donner une impression de subjectivité, l'examen dysmorphologique repose sur une analyse méthodologique rigoureuse de tous les composants du visage [1].

Les données de l'interrogatoire

L'enquête familiale est un élément essentiel du bilan. Elle n'est pas toujours aisée et les tabous familiaux peuvent rendre difficile l'établissement de l'arbre généalogique. Celui-ci permet parfois d'évoquer un mode héréditaire spécifique et de restreindre le champ des hypothèses diagnostiques. L'interrogatoire s'attachera à faire préciser l'histoire de la grossesse et de l'accouchement, la prise éventuelle d'agents tératogènes, d'alcool, l'existence d'un épisode infectieux ou d'une pathologie maternelle. La reconstitution de l'histoire pédiatrique de l'enfant est essentielle. La dysmorphie ne doit être un motif de consultation et d'explorations que si elle s'intègre dans un contexte malformatif ou de déficience intellectuelle. Les étapes du développement psychomoteur, les complications neurologiques (épilepsie, régression, etc.), l'existence éventuelle de traits de comportements particuliers, certains événements d'allure banale (eczéma, éruptions cutanées, fièvre récurrente, diarrhée, etc.) doivent être notés.

Introduction

Les anomalies du développement et les syndromes malformatifs concernent environ 3 % des naissances. La naissance d'un enfant présentant une anomalie du développement, ou sa découverte pendant la grossesse, suscite chez les parents la question du pronostic vital et mental de l'enfant, ainsi que celle du risque de récurrence pour une grossesse suivante. Seul un diagnostic étiologique précis de la pathologie malformative permet de répondre à ces deux questions. Environ 2 500 syndromes dysmorphiques ou malformatifs sont actuellement identifiés. Un grand nombre d'entre eux associe une déficience intellectuelle et, souvent, seules de minimes variations de l'apparence faciale sont observées, sans malformations associées.

Les mécanismes de reconnaissance du visage font appel à des fonctions perceptives que chacun d'entre nous possède, lui permettant de repérer un visage connu parmi une foule d'inconnus. Lors de l'examen de l'enfant, c'est l'association des variations morphologiques mineures du visage qui vont permettre de parfois aboutir au diagnostic. Il s'agit du concept d'identification subjective d'un visage (*Gestalt*). Cependant, si les généticiens cliniciens expérimentés en

Examen clinique

Principes généraux

L'examen clinique en dysmorphologie est descriptif et se doit d'être complet et rigoureux. L'approche doit être systématique, par région anatomique, mais n'obéit pas obligatoirement à un rituel. Les mesures standards (poids, taille, périmètre crânien) sont des éléments indispensables de l'examen. Tous les éléments morphologiques sont mesurables et peuvent être comparés à des abaques [2]. La description précise de la morphologie faciale d'un enfant repose sur une terminologie précise [3–9] dont nous n'avons détaillé que quelques points. Tous les termes scientifiques employés doivent être traduits en langage simple accessible aux parents dans les différents courriers. Les photographies du visage, des extrémités et de toute autre variation morphologique identifiée, font partie intégrante de l'examen dysmorphologique. Il peut être utile de demander des photographies du patient à différents âges car la dysmorphie peut évoluer avec la croissance. Le consentement écrit des patients (ou des titulaires de l'autorité parentale) est indis-

pensable. L'identification chez un parent d'une anomalie mineure ou d'un signe dysmorphique présent chez l'enfant peut correspondre soit à un simple trait familial hérité, sans rapport avec la pathologie de l'enfant, soit à l'expression mineure d'un syndrome dominant à expressivité variable.

Aspect général de la face

Une impression générale peut se dégager de l'examen général d'une face. Le visage peut avoir une forme allongée, large, étroite, ovale, ronde, triangulaire, plate ou se caractériser par des traits grossiers. Le visage peut être divisé en trois étages. L'étage supérieur est délimité par la ligne d'implantation des cheveux et une ligne horizontale passant par la glabella (point le plus saillant de l'os frontal au-dessus de la racine du nez). L'étage moyen est situé entre la glabella et la base du nez. L'étage inférieur est délimité en bas par la pointe du menton. Dans un visage équilibré, ces trois segments ont une taille à peu près égale, alors que chez le nouveau-né, l'étage supérieur est plus développé. Une vue de profil permet de visualiser la position du menton. On parle de prognathie mandibulaire lorsqu'il y a une protrusion antérieure de la mandibule et de rétrognathie lorsque la pointe du menton est en arrière d'une ligne verticale passant par la glabella et les ailes du nez.

Le crâne

L'inspection du crâne est faite de face, de profil et en vue supérieure, afin de juger de sa configuration, de sa symétrie, et de l'impression générale des proportions du crâne par rapport aux repères faciaux. Le crâne est étudié dans ses formes et ses dimensions. La mesure du périmètre crânien (circonférence occipito-frontale) définit la notion de macrocéphalie (supérieur à + 2 DS), de microcéphalie (inférieur à - 2 DS), ou de normocéphalie. Le crâne peut être brachycéphale (raccourcissement dans le sens antéro-postérieur avec un aplatissement de l'occiput), ou au contraire dolichocéphale (allongement antéro-postérieur). Certaines variations ne sont pas pathologiques (ex. : crâne volontiers dolichocéphale des enfants prématurés), d'autres sont le reflet de véritables anomalies du développement comme les craniosténoses, dont le diagnostic est aidé par l'examen des sutures crâniennes et confirmé par l'exploration radiologique. La palpation est importante pour juger des sutures crâniennes et des fontanelles. La fontanelle antérieure, toujours ouverte à la naissance, est en général réduite à un centimètre carré vers l'âge de 18 mois. La fontanelle postérieure est fermée dans les deux semaines qui suivent la naissance.

Le front

L'étude du front participe à définir la morphologie crânio-faciale, mais peut être précisée dans sa description : front haut ou bas, large ou étroit (rétraction bitemporale), bombé ou plat, vertical ou fuyant (dans un contexte de microcéphalie). La hauteur de l'implantation des cheveux sur le front, ainsi que la forme de l'implantation sont notées si elles présentent des particularités : aspect d'épis frontaux ou implantation en pointe (*widow's peak*) par exemple.

La région oculaire

L'étude de la région oculaire inclut les fentes palpébrales, les orbites, les globes oculaires et les cils. L'étude des globes oculaires recherche des anomalies de taille des globes (microphthalmie, anophtalmie, buphtalmie, mégalocornée). L'écartement interoculaire est défini par le rapport entre la distance entre les canthi internes (angles internes des fentes palpébrales) sur la distance entre les canthi externes. Dans un visage équilibré, ce rapport est globalement égal à 1/3 (un œil entre les deux yeux). Le rapport est supérieur à 1/3 en cas d'hypertélorisme et inférieur en cas d'hypotélorisme. Il convient de décrire l'orientation des fentes palpébrales de l'angle interne à l'angle externe : horizontal, oblique en haut et en dehors, ou en bas et en dehors. Lorsque les fentes palpébrales sont anormalement étroites, on parle de blépharophimosis. Un épicanthus (repli à l'angle interne de l'œil) ou un télécanthus (déplacement latéral des canthi internes) peuvent donner une fausse impression d'hypertélorisme. Un repli épicanthique est fréquent chez le nouveau-né, mais est inhabituel après l'âge de 18 mois dans les populations européennes. Un ptosis correspond à la chute de la paupière supérieure. Un proptosis est un éversionnement de la paupière inférieure laissant apparaître la sclérotique et accompagne souvent une exophtalmie. Une éversion de la partie externe des paupières inférieures se retrouve dans le syndrome de Kabuki (figure 13.1). L'iris peut être le siège



Figure 13.1
Syndrome de Kabuki.

d'anomalies de la pigmentation (hétérochromie irienne) ou d'anomalies morphologiques comme un colobome. Des anomalies des sclérotiques (aspect bleuté rencontré dans l'ostéogénèse imparfaite, télangiectasies, pigmentation anormale, etc.) doivent être notées.

L'aspect des sourcils est précisé : forme générale, situation (haut ou bas par rapport aux repères oculaires), épaisseur et orientation (sourcils horizontaux ou au contraire arqués). Le synophrys qui correspond à une extension interne des sourcils qui se rejoignent sur la ligne médiane est fréquent à l'âge adulte dans les populations méditerranéennes. Par contre, il est souvent pathologique chez le nouveau-né et l'enfant jeune. Il est retrouvé par exemple dans le syndrome de Cornelia de Lange (e-figure 13.2). Un défaut d'implantation des cils est recherché.

Le nez

Il existe une grande variation normale de taille et de forme générale du nez. La comparaison aux caractéristiques familiales des parents reste indispensable. La forme du nez peut être détaillée en évaluant ses différents composants : racine, crête nasale, pointe, ailes du nez, narines, columelle. La racine du nez peut être aplatie, déprimée (ensellée), saillante, large ou étroite. Une dépression de la racine du nez est la règle pour les enfants de moins d'un an et son hypertrophie est un signe de dysmorphie à cet âge. Les ailes du nez peuvent être antéversées, hypoplasiques ou le siège de petites encoches. La columelle, ou sous-cloison nasale, peut être proéminente ou en retrait, comme dans le syndrome ATR-X (e-figure 13.3) où elle est située en dessous du niveau horizontal des ailes du nez. La pointe peut être bifide. Les narines peuvent être antéversées, comme dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (e-figure 13.4).

Le philtrum

Le philtrum correspond à l'espace entre la columelle et le vermillon de la lèvre supérieure. Il est normalement creusé d'un sillon (gouttière philtrale) bordé par les deux piliers du philtrum. Il peut être long et effacé, comme dans le syndrome d'alcoolisme fœtal (e-figure 13.5) ou court. Il est le siège des fentes dont il importe de décrire le siège. Une fente labiale médiane n'est jamais banale et peut être évocatrice de syndromes.

La bouche

Il convient de décrire au niveau de la bouche la taille, le dessin et l'épaisseur des lèvres. On parle de microstomie lorsque

la bouche est anormalement petite et de macrostomie si elle est trop grande, parfois liée à la présence d'une fente latérale. On recherche également des sinus ou puits labiaux.

L'examen de l'intérieur de la cavité orale peut révéler une fente palatine (ou une luvette bifide), une hyperplasie gingivale, une lobulation ou une anomalie de taille ou de morphologie de la langue, une indentation du rebord alvéolaire, des anomalies de morphologie, du nombre ou d'implantation des dents, ainsi que de possibles anomalies de la dentine ou de l'émail.

Les oreilles

Les différentes parties constituant l'oreille sont détaillées sur la figure 13.6. L'oreille peut être petite (microtie), ou grande (macrotie). L'oreille est implantée normalement lorsque la ligne horizontale qui joint le canthus externe de l'œil à l'occiput coupe l'oreille au niveau de son tiers supérieur. Dans une oreille d'allure anormale, tous les différents constituants de l'oreille doivent être décrits. Des marqueurs pré ou rétro-auriculaires, comme des fossettes et appendices prétragien (chondromes, condylomes) doivent être notés.

Les extrémités

L'examen des extrémités constitue après la face, le second pôle d'intérêt de l'examen dysmorphologique. La présence de malformations même mineures des mains et des pieds

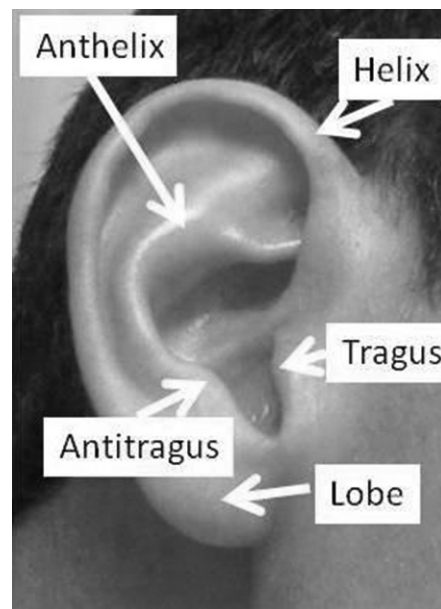


Figure 13.6
Parties constituant l'oreille.



e-figure 13.2

Syndrome de Cornelia de Lange.



e-figure 13.4

Syndrome de Smith-Lemli-Opitz.



e-figure 13.3

Syndrome ATR-X.



e-figure 13.5

Syndrome d'alcoolisme fœtal.

est un argument en faveur d'une anomalie du développement anténatal. Une anomalie distincte des extrémités peut permettre le diagnostic, comme les pouces et/ou gros orteils larges avec parfois déviation angulaire dans le syndrome de Rubinstein-Taybi (e-figure 13.7). Les anomalies de nombre des doigts, qu'elles soient par excès (polydactylie) (e-figures 13.8A et 13.8B) ou par défaut (oligodactylie) (e-figure 13.9), doivent être décrites avec précision. L'anomalie est post-axiale lorsqu'elle touche le rayon cubital, et pré-axiale s'il s'agit du rayon radial. Des radiographies sont souvent indispensables dans la description. La polydactylie peut se résumer à un simple bourgeon charnu dont l'ablation est très facile dans les premiers jours de la vie. La clinodactylie (recourbement du doigt en crochet dans le plan de la main) est liée à un défaut de développement de la phalange médiane qui peut être absente avec disparition d'un pli de flexion (brachymésophalangie). La clinodactylie du cinquième doigt est peu spécifique. La camptodactylie, liée au blocage d'une articulation en flexion, peut être le témoin d'une atteinte neuromusculaire. Lorsque les doigts sont courts, on parle de brachydactylie, alors que l'arachnodactylie traduit des doigts longs. Le raccourcissement d'un ou plusieurs métacarpien/s (brachymétacarpie) ou métatarsien/s (brachymétatarsie) se traduit par une implantation proximale d'un doigt par rapport aux autres. La brachymétacarpie des 4^e et 5^e doigts, classique par exemple dans l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright, est mieux identifiée en faisant serrer les poings (absence de saillie).

La syndactylie, définie comme la fusion d'un ou plusieurs doigts, n'est jamais banale au niveau des mains. Elle peut être seulement cutanée ou aussi osseuse. Certaines syndactylies sont presque spécifiques d'une pathologie donnée, c'est pourquoi elles doivent être décrites avec précision. Au niveau des pieds, la syndactylie cutanée entre le 2^e et le 3^e orteil (2–3) est banale dans un contexte familial, mais peut être un critère diagnostique dans un contexte syndromique, comme dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (figure 13.10). L'axe de la main peut être dévié vers le bord radial ou cubital (main bote radiale ou cubitale).

Le cou et le thorax

Le cou peut être large, avec un aspect palmé, c'est le *pterygium colli*, classique dans le syndrome de Turner et le syndrome de Noonan (figure 13.11). Il peut aussi être le siège de fistules. Le thorax peut avoir un aspect bombé avec un écartement anormal des mamelons, c'est le thorax en bouclier, ou au contraire étroit. Le *pectus excavatum* (ou thorax en entonnoir) correspond à un enfoncement du sternum,

classique dans le syndrome de Noonan (e-figure 13.12), alors que le sternum est saillant dans le thorax en carène (*pectus carinatum*). La présence de mamelons surnuméraires peut orienter le diagnostic vers un syndrome de Simpson-Golabi-Behmel par exemple.

Le reste de l'examen physique

L'examen physique doit être complet. Les organes génitaux, l'anus peuvent aussi être le siège de variations morphologiques et doivent être examinés de manière systématique. L'examen cutané peut révéler des différences de



Figure 13.10
Syndrome de Smith-Lemli-Opitz.

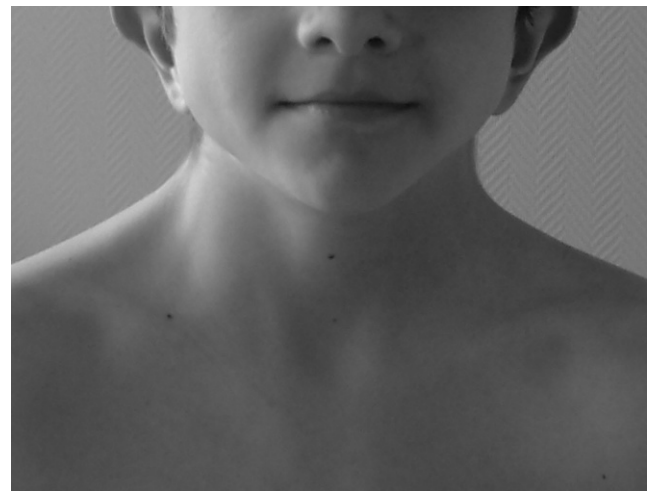


Figure 13.11
Pterygium colli.



e-figure 13.7
Syndrome de Rubinstein-Taybi.



e-figure 13.9
Oligodactylie.



e-figure 13.8
Exemples de polydactylie.





e-figure 13.12

Syndrome de Noonan.

pigmentation sur les lignes de développement de Blaschko, pouvant traduire un mosaïcisme génétique.

Les données de l'imagerie

Il peut exister au niveau des organes des variations morphologiques sans traduction clinique (duplicité rénale, crosse aortique droite, etc.) dont la valeur sémiologique est importante. Les indications des examens échographiques doivent être larges, incluant l'échographie cérébrale chez le nourrisson et des échographies cardiaque et rénale systématiques dans une anomalie du développement. De même, un examen ophtalmologique est volontiers demandé. Par contre, les radiographies du squelette et l'imagerie cérébrale seront prescrites en fonction du contexte clinique.

Conclusion

L'examen en dysmorphologie permet d'aboutir à un diagnostic et à un conseil génétique qui peuvent être confirmés aujourd'hui par un test moléculaire dans un certain nombre de situations. L'identification clinique des anomalies du développement a permis depuis quelques années d'identifier un grand nombre de gènes du développement et de mieux appréhender le développement normal et anormal de l'embryon humain. Les progrès récents des approches pangénomiques (puces à ADN ou CGH-array, voir [chapitre 7](#), «Cytogénétique moléculaire») et du séquençage de nouvelle génération à haut débit (NGS, voir [chapitre 11](#),

«Le séquençage de nouvelle génération») permettent d'espérer une aide biologique majeure dans les cas non résolus dans les prochaines années. Cependant, il serait dangereux de croire que l'expertise clinique deviendrait alors inutile au vu des performances biologiques, car l'approche dans ce domaine est clinico-biologique et complémentaire.

Références

- [1] Philip N, Lacombe D. Examen de l'enfant dysmorphique. In : Lacombe D, Philip N, editors. Syndromes dysmorphiques. Rueil-Malmaison : Doin ; 2013.
- [2] Hall JG, Froster-Iskenius U, Allanson JE. Handbook of physical measurements. Oxford, New-York, Toronto : Oxford University Press ; 1989.
- [3] Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, et al. Elements of morphology : introduction. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 2–5.
- [4] Allanson JE, Cuniff C, Hoyne HE, et al. Elements of morphology : standard terminology for the head and face. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 6–28.
- [5] Hall BD, Graham Jr. JM, Cassidy SB, et al. Elements of morphology : standard terminology for the periorbital region. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 29–39.
- [6] Hunter A, Frias JL, Gillissen-Kaesbach G, et al. Elements of morphology : standard terminology for the ear. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 40–60.
- [7] Hennekam RC, Cormier-Daire V, Hall JG, et al. Elements of morphology : standard terminology for the nose and philtrum. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 61–76.
- [8] Carey JC, Cohen Jr. MM, Curry CJ, et al. Elements of morphology : standard terminology for the lips, mouth, and oral region. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 77–92.
- [9] Biesecker LG, Aase JM, Clericuzio C, et al. Elements of morphology : standard terminology for the hands and feet. Am J Med Genet A 2009 ; 149A : 93–127.

ENTRAÎNEMENT 13 QCM-QCS

QCM 1

Quels traits sont fréquents et banals chez l'enfant de moins de 1 an :

- A. Un étage supérieur de la face plus développé que chez l'adulte
- B. Une dépression de la racine du nez
- C. Un synophrys
- D. Une clinodactylie des 5^{es} doigts
- E. Un *pectus excavatum*

QCS 1

Un hypertélorisme est défini par :

- A. Un rapport distance intercanthale externe/distance intercanthale interne > 1/3
- B. Un rapport distance intercanthale interne/distance intercanthale externe > 1/3

- C. Un rapport distance intercanthale interne/distance intercanthale externe < 1/3
- D. Un rapport distance intercanthale externe/distance intercanthale interne < 1/3
- E. Un rapport longueur des fentes palpébrales/ distance intercanthale > 1/2

QCS 2

Un télécanthus se définit par :

- A. Des fentes palpébrales étroites
- B. Une chute de la paupière supérieure
- C. Un déplacement latéral des canthi internes
- D. Un déplacement latéral des canthi externes
- E. Aucun item n'est exact

QCS 3

Un hypotélorisme se définit par :

- A. Un repli à l'angle interne de l'œil
- B. Une diminution de l'écartement entre les yeux
- C. Un déplacement latéral des canthi internes
- D. Un déplacement latéral des canthi externes
- E. Aucun item n'est exact

QCS 4

Une clinodactylie se définit par :

- A. Un pouce surnuméraire
- B. Le blocage d'une articulation en flexion
- C. La présence d'un sixième doigt au bord cubital
- D. Une absence de phalange médiane
- E. Aucun item n'est exact

QCS 5

À chacun des mots suivants :

1 : *pterygium colli*; 2 : hypotélorisme; 3 : clinodactylie; 4 : microstomie; 5 : proptosis; 6 : polydactylie pré-axiale; correspond une définition :

a : petit estomac; b : blocage d'une articulation en flexion; c : chute de la paupière supérieure; d : diminution de l'écartement entre les yeux; e : pouce surnuméraire; f : présence d'un 6^e doigt au bord cubital; g : repli à l'angle interne de l'œil; h : cou large; i : aucune définition ne correspond.

Quelle est la proposition juste ?

- A. 1 : h; 2 : d; 3 : b; 4 : a; 5 : c; 6 : e
- B. 1 : i; 2 : d; 3 : b; 4 : a; 5 : c; 6 : e
- C. 1 : h; 2 : i; 3 : b; 4 : a; 5 : i; 6 : f
- D. 1 : h; 2 : d; 3 : i; 4 : i; 5 : i; 6 : e
- E. 1 : i; 2 : d; 3 : i; 4 : i; 5 : i; 6 : f

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 13.2

Syndrome de Cornelia de Lange.

**e-figure 13.3**

Syndrome ATR-X.

**e-figure 13.4**

Syndrome de Smith-Lemli-Opitz.

**e-figure 13.5**

Syndrome d'alcoolisme fœtal.

**e-figure 13.6**

Syndrome de Rubinstein-Taybi.

**e-figure 13.8**

Exemples de polydactylie.



e-figure 13.9

Oligodactylie.



e-figure 13.12

Syndrome de Noonan.



Hétérogénéité des maladies génétiques

Stanislas Lyonnet, Josué Feingold

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	162
Hétérogénéité allélique	163
Hétérogénéité de locus (ou hétérogénéité génétique au sens restreint)	165
Pléiotropie ou hétérogénéité phénotypique	165
Hétérogénéité de modèles génétiques	166
Hétérogénéité génétique dans les modèles multigéniques et multifactoriels	166



L'essentiel à retenir

L'hétérogénéité génétique est une situation dans laquelle un phénotype peut avoir pour origine plusieurs allèles à un même locus (hétérogénéité allélique) ou plusieurs altérations non alléliques à des loci indépendants (hétérogénéité de locus, parfois appelée plus couramment hétérogénéité génétique au sens restreint).

L'hétérogénéité génétique est à distinguer du mode d'hérédité multigénique où il est postulé que plusieurs variants indépendants, à des loci non liés, peuvent, chez un même patient, concourir à son phénotype.

L'hétérogénéité génétique peut être classée sommairement en :

- hétérogénéité allélique par laquelle, à un locus donné, un répertoire de mutations du même gène peut conduire à une même expression phénotypique;
- hétérogénéité de locus, par laquelle des variations de gènes indépendants peuvent conduire aux mêmes phénotypes, impossibles à distinguer cliniquement.

Trois autres notions sont importantes à évoquer au sein de ce chapitre :

- la pléiotropie, ou hétérogénéité de phénotypes, dans laquelle les mutations d'un même gène peuvent conduire à des phénotypes différents;
- l'hétérogénéité de modèles génétiques, selon laquelle une même maladie peut obéir à des modèles d'hérédité différents;
- l'hétérogénéité génétique dans le cadre du modèle multifactoriel, modèle dans lequel on pressent une hétérogénéité particulièrement marquée non seulement des variants en cause à un même locus (variants différents à un même locus en cause), mais surtout des loci concernés chez des individus différents.

Introduction

L'hétérogénéité génétique est une situation dans laquelle un phénotype peut avoir pour origine plusieurs allèles à un même locus (hétérogénéité allélique) ou plusieurs altérations non alléliques à des loci indépendants (hétérogénéité de locus, parfois appelée plus couramment hétérogénéité génétique au sens restreint).

À l'heure du séquençage de nouvelle génération de panels de gènes, d'exomes, voire de génomes, cette notion

ne fait que reprendre de l'importance tant elle est à l'origine de grandes difficultés dans les domaines suivants :

- assignation d'un phénotype à un variant rare;
- assignation d'un phénotype à un locus morbide plutôt qu'un autre, mettant ainsi en jeu l'ensemble des avis de consultations de génétique, conseils génétiques, que ce soit en matière pré- ou postnatale, qui dépend intimement de la solidité de ces affirmations.

L'hétérogénéité génétique est à distinguer du mode d'hérédité multigénique où il est postulé que plusieurs variants indépendants, à des loci non liés, peuvent, chez un même patient, concourir à son phénotype.

L'hétérogénéité génétique peut être classée sommairement en :

- hétérogénéité allélique (figure 14.1), par laquelle, à un locus donné, un répertoire de mutations du même gène peut conduire à une même expression phénotypique;
- hétérogénéité de locus (figure 14.2), par laquelle des variations de gènes indépendants peuvent conduire aux mêmes phénotypes, impossibles à distinguer cliniquement.

Par esprit de système, nous traiterons dans ce chapitre trois notions complémentaires :

- la pléiotropie, ou hétérogénéité de phénotypes (figure 14.3), dans laquelle les mutations d'un même gène peuvent conduire à des phénotypes différents, parfois même opposés, notamment selon les mécanismes mutationnels en cause (par exemple, mutation gain de fonction et perte de fonction à un même locus, conduisant à la perte ou au contraire à l'activation de la protéine codée par le gène);
- l'hétérogénéité de modèles génétiques, selon laquelle une même maladie peut obéir à des modèles d'hérédité différents; soit dans le cadre d'une hétérogénéité de locus (formes récessives ou formes dominantes de rétinopathies pigmentaires par exemple), soit encore pour un groupe de maladies se comportant sur des modèles récessifs ou dominants à un même locus, selon la nature des allèles concernés;
- l'hétérogénéité génétique dans le cadre du modèle multifactoriel, modèle qui n'exclut pas une hétérogénéité de locus, puisqu'au contraire les données récentes sur la déconstruction de l'architecture des maladies multigéniques vont plutôt dans le sens d'une très grande hétérogénéité non seulement des variants en cause à un même locus, mais surtout des loci concernés chez des individus différents (voire dans des populations différentes, parfois stratifiées selon leur histoire et leurs migrations).

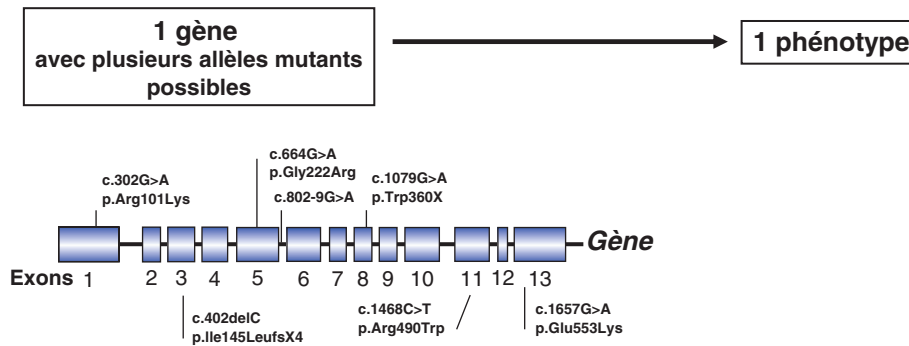


Figure 14.1

Représentation schématique de la notion d'hétérogénéité allélique.

L'hétérogénéité allélique désigne un répertoire de multiples allèles mutants à un même locus, conduisant à un même phénotype, possiblement avec une expression variable en fonction des allèles concernés.

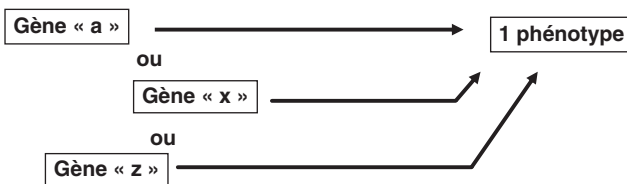


Figure 14.2

Représentation schématique de la notion d'hétérogénéité de locus (ou hétérogénéité génétique au sens restreint).

L'hétérogénéité de locus correspond à la possibilité d'altération de gènes indépendants (non liés) conduisant à un même phénotype chez des patients et des familles différentes.

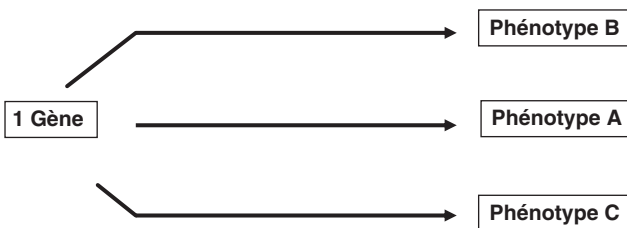


Figure 14.3

Représentation schématique de la notion de pléiotropie (ou hétérogénéité de phénotypes).

Le terme de pléiotropie peut être utilisé pour décrire l'existence de phénotypes différents causés par des mutations de nature différente, mais à un même locus.

Hétérogénéité allélique

L'hétérogénéité allélique (figure 14.1) désigne un répertoire de multiples allèles mutants à un même locus, conduisant à un même phénotype, possiblement avec une expression variable en fonction des allèles concernés. Ainsi, pour une même maladie génétique, des répertoires alléliques de plusieurs centaines de mutations sont connus, l'exemple le plus caricatural étant celui de la mucoviscidose au locus de laquelle (*CFTR*) plus de 1000 mutations sont actuellement

décrites. Cette notion est capitale puisqu'elle sous-tend que l'assignation d'un variant à un phénotype peut s'avérer complexe alors même qu'elle fonde la qualité et la fiabilité du test génétique.

De manière générale, on peut clairement établir que l'hétérogénéité allélique est la règle plutôt que l'exception, les maladies à homogénéité allélique étant de très loin les plus rares ; citons parmi elles la drépanocytose, maladie de l'hémoglobine autosomique récessive pour laquelle une seule et unique mutation faux-sens au codon 6 du gène β -globine conduit à un phénotype exclusif de falciformation des globules rouges. Tous les malades drépanocytaires sont homozygotes pour ce même allèle et, à l'inverse, seul cet allèle conduit à la drépanocytose. Il y a donc là un exemple d'homogénéité allélique total. On peut aussi citer d'autres groupes de maladies autosomiques récessives, comme les amyotrophies spinales infantiles pour lesquelles, malgré un phénotype hétérogène et variables en âge de début et en progressivité de la maladie, une mutation pourtant très majoritaire est impliquée : la délétion homozygote du gène *SMN1*.

Notons que, dans les modèles dominants, l'homogénéité allélique est plutôt le fait de maladies par gain de fonction, dans lesquelles un et un seul allèle peut conférer à une protéine une activité excessive comme, par exemple, les mutations gain de fonction au locus *FGFR3* dans l'achondroplasie ou encore les mutations gain de fonction au locus *RET* dans les endocrinopathies néoplasiques multiples de type II.

Pourtant, comme indiqué plus haut, l'hétérogénéité allélique est bien plus la règle que l'exception. Le répertoire variable des allèles mutants est d'ailleurs en général un indicateur d'un mécanisme perte de fonction, puisqu'à l'opposé des mutations gain de fonction, les altérations conduisant à la disparition ou la diminution de l'expression d'un gène peuvent être multiples (mutation tronquante de tout type, non-sens, décalage de phase de lecture, mutation

du système d'excision-épissage, ou encore répertoire quasi infini des mutations faux-sens possibles à un même locus; voir [chapitre 9, «Anomalies génétiques à l'échelle du gène»](#)). L'hétérogénéité allélique a comme corolaire la difficulté fréquente d'attribuer le statut de mutation délétère avec effet pathogène à un variant rare. Cette situation permet de rappeler quelques éléments permettant cette attribution (notions également détaillées dans le [chapitre 9, «Anomalies génétiques à l'échelle du gène»](#)) :

- arguments épidémiologiques fondés sur les bases de données qui permettent de colliger les allèles mutants déjà répertoriés à un même locus. La fréquence de polymorphismes et de mutations peut d'ailleurs varier considérablement d'une population à l'autre et la quantité de données disponibles reste actuellement très biaisée en faveur des populations européennes. À titre d'exemple, la prévalence de la mutation deltaF508, parmi les allèles mutants au locus *CFTR*, varie de plus de 85 % dans les pays scandinaves et le nord-ouest de l'Europe, à moins de 40 % en Afrique du Nord; et le répertoire des mutations prévalentes n'est pas clairement établi dans nombre de populations;
- arguments génétiques fondés sur la ségrégation de l'allèle mutant suivant le mode d'hérédité de la maladie concernée dans une famille déterminée;
- arguments structuraux fondés sur nature de la mutation et de son effet présumé, en opposant les mutations tronquantes, pour lesquelles un effet délétère est très vraisemblable, aux mutations faux-sens pour lesquelles cet effet ne peut qu'être présumé, par exemple grâce à des outils bio-informatiques. Cela est particulièrement délicat; soulignons à titre d'exemple les effets indirects que nombre de mutations faux-sens exercent sur les mécanismes d'excision-épissage;
- arguments évolutifs, comme le degré de conservation phylogénique d'un acide aminé en cas de mutation faux-sens;
- arguments fonctionnels, enfin, par la confirmation du caractère délétère qu'un variant peut exercer sur l'expression du gène ou la fonction de la protéine pour laquelle il code, évalué par test *in vitro* le plus souvent, voire *in vivo* en modèle animal.

Ainsi, l'hétérogénéité allélique justifie de s'interroger sur les origines d'un patient en consultation de génétique et d'adapter les tests génétiques, les trousse diagnostiques ou les méthodes de séquençage, à une situation personnalisée, non seulement par le phénotype que présente le malade, mais aussi par son origine géographique. C'est ainsi que la valeur prédictive positive et les valeurs prédictives négatives d'avoir ou de ne pas avoir un allèle mutant à un locus déterminé vont varier suivant la stratification et la prévalence des allèles concernés dans la population d'origine du patient

concerné. L'hétérogénéité du répertoire allélique est donc aussi une notion de grande importance en termes d'évolution génétique et d'histoire des populations humaines.

Un autre impact de l'hétérogénéité allélique est qu'elle se trouve à l'origine d'une part importante de la variabilité d'expression des maladies génétiques en jouant à deux titres :

- le répertoire des allèles mutants qui peuvent conduire à des effets plus ou moins sévères sur l'expression d'un gène, permettant d'expliquer une fraction de la variabilité d'expression interfamiliale, et cela quel que soit le modèle génétique concerné (autosomique, récessif ou dominant, ou lié au chromosome X);
- dans le modèle des maladies autosomiques récessives, il est aussi habituel de voir qu'un patient, homozygote au locus morbide est en fait porteur d'allèles mutants différents à ce locus. On parle d'hétérozygote composite. Il s'agit là également d'un degré de complexité permettant aussi d'expliquer la variabilité d'expression interfamiliale d'une maladie autosomique récessive à un même locus. On parle en revanche d'homozygote vrai lorsqu'un patient homozygote pour des allèles mutants à un locus déterminé dans une maladie autosomique récessive est porteur de deux mutations identiques. Cette dernière situation peut évoquer la prévalence particulière d'un allèle dans une population déterminée; elle peut aussi être le fait d'une homozygotie par la descendance, pour un seul et même allèle ancestral qui montre un degré de parenté (malades consanguins). La notion d'hétérozygotie composite doit être clairement distinguée de la notion de double hétérozygote qui définit un individu hétérozygote pour des allèles différents à des loci indépendants, généralement sans conséquence phénotypique notamment dans le cadre des maladies autosomiques récessives.

L'hétérogénéité du répertoire allélique à un locus donné a ainsi un impact sur la compréhension des corrélations entre génotypes et phénotypes puisqu'elle permet d'établir des comparaisons inter- ou intrafamiliales pour des caractères quantitatifs ou qualitatifs assignés à une maladie (caractères qualitatifs : âge de début, intensité d'un signe comme, par exemple, pour la mucoviscidose le taux de chlore sudoral, gravité de l'atteinte respiratoire dans cette maladie, etc./ caractères quantitatifs : avoir ou ne pas avoir un signe faisant partie du panel des symptômes assignés à une maladie, comme l'iléus méconial ou l'insuffisance pancréatique de la mucoviscidose).

Ces éléments permettent d'établir la notion de variabilité intrafamiliale et/ou de variabilité interfamiliale et, par là même, de présumer de l'existence de gènes ou d'allèles modificateurs au locus de la maladie ou à des loci indépendants.

Hétérogénéité de locus (ou hétérogénéité génétique au sens restreint)

L'hétérogénéité de locus (figure 14.2) correspond à la possibilité d'altération de gènes indépendants (non liés) conduisant à un même phénotype chez des patients et des familles différents. Les maladies sujettes à hétérogénéité de locus sont bien plus nombreuses qu'il était imaginé au début de l'histoire de la pathologie moléculaire. Elles s'expliquent par des mutations indépendantes touchant des gènes indépendants chez des malades différents : dans la famille A, le locus « a » est l'objet de mutation(s) ; dans la famille B, le locus « b », indépendant du locus « a » est l'objet de mutation(s) ; ces deux familles, et les mutations de ces deux gènes, conduisant à un phénotype impossible à distinguer. Non liés génétiquement, ces gènes peuvent en revanche avoir un lien fonctionnel, codant, par exemple, pour des produits qui agissent à des étapes différentes d'une même voie de signalisation cellulaire (concept de « RASopathies » à titre d'exemple), d'une même cascade métabolique ou pour des protéines participant à un même édifice ultrastructural du cytosquelette cellulaire.

Les exemples d'hétérogénéité de locus sont désormais nombreux et parmi les plus marquants :

- l'hétérogénéité génétique des paraplégies spastiques de l'adulte ou plus de 50 loci sont aujourd'hui identifiés comme possiblement responsables ;
- des surdités neurosensorielles ;
- des rétinites pigmentaires ;
- de la déficience intellectuelle non syndromique, qu'elle soit ou non liée au chromosome X.

Naturellement, l'hétérogénéité génétique constitue une des plus grandes difficultés de la médecine génétique puisqu'à un phénotype unique peuvent correspondre des mutations de loci indépendants (et donc des gènes différents). On imagine facilement l'impact que ce type d'observation peut avoir dans la fiabilité et la solidité d'un test génétique. En soulignant, par exemple, l'erreur qu'il y aurait à fonder un diagnostic prénatal sur la co-ségrégation de marqueurs à un locus A (diagnostic indirect ou la présence/absence de la mutation est déduite de l'haplotype observé au risque près d'une double recombinaison entre les marqueurs étudiés), connu pour être impliqué majoritairement dans une maladie génétique, sans avoir identifié les mutations pathogènes (qui permet un diagnostic direct) et alors même que dans la famille analysée le gène impliqué est indépendant du locus A.

Pléiotropie ou hétérogénéité phénotypique

La notion de pléiotropie (figure 14.3) correspond à l'identification progressive, notamment à partir des années 1990, de l'existence de phénotypes différents causés par des mutations de nature différente, mais à un même locus. Plusieurs de ces exemples ont marqué l'histoire de la génétique :

- mutations du locus *PMP22* qui, selon leurs natures, perte de fonction (par délétion) ou gain de fonction (par duplication), peuvent conduire respectivement à une neuropathie tomaculaire ou une maladie de Charcot-Marie pour des allèles mutants d'un même locus ;
- répertoires variés des mutations, notamment des délétions exoniques au locus de la dystrophine, conduisant à la forme classique de myopathie de Duchenne (le plus souvent pour des délétions ne respectant pas le cadre de lecture de la protéine) ou, au contraire, au phénotype atténué et initialement décrit indépendamment de myopathie de Becker (le plus souvent alors pour des délétions exoniques respectant le cadre de lecture de la protéine) ;
- répertoires des allèles au locus *FGFR3*, conduisant à une gradation de chondrodysplasies allant de la forme classique d'achondroplasie jusqu'à des formes très modestes d'hypochondroplasies ou, au contraire, jusqu'aux formes létales du nanisme thanatophore ;
- mutations du locus *RET*, enfin, codant pour un proto-oncogène récepteur tyrosine-kinase qui, suivant leurs natures, perte ou gain de fonction, vont conduire à l'état hétérozygote à une maladie de Hirschsprung (avec un répertoire allélique extrêmement varié de mutations perte de fonction, une variabilité d'expression et des défauts de pénétrance dans un modèle oligogénique) ou, au contraire, à une activation du proto-oncogène *RET* par mutation gain de fonction dans les phénotypes d'endocrinopathies néoplasiques multiples de type 2A, 2B ou les carcinomes médullaires familiaux de la thyroïde pour quelques rares et spécifiques mutations faux-sens qui activent constitutivement le récepteur tyrosine-kinase RET.

On pourrait, ici aussi, parler d'hétérogénéité allélique mais les phénotypes en question, résultant de ces variations, sont si différents que cette situation mérite d'être individualisée. Cette notion est importante en recherche génétique puisqu'elle invite à ne pas écarter la possibilité d'un gène candidat dans une maladie au prétexte que ce gène aurait déjà été impliqué dans un autre phénotype.

Pour mémoire, à certains loci, quelques allèles à effets complexes peuvent aboutir à la coexistence de deux phénotypes. Cela a été décrit par exemple pour le locus *RET* où

certaines mutations faux-sens des exons 10 et 11 sont à la fois des mutations perte de fonction à un temps, conduisant alors à une prédisposition à la maladie de Hirschsprung (par défaut d'accès du récepteur mutant à la membrane cellulaire des cellules de crête neurale en migration) et gain de fonction, les quelques récepteurs mutants qui atteignent la membrane cellulaire se dimérisant de façon constitutive (i.e. même en l'absence de ligand) prédisposant ainsi à un phénotype tumoral de type MEN 2A. D'autres mutations de cet ordre ont été décrites, notamment au locus β -globine où certains allèles peuvent se comporter en même temps comme une perte de fonction, résultant en un phénotype thalassémique et une modification de la protéine, conduisant à une hémoglobine anormale, avec un phénotype final mixte : thalassémique et hémoglobinopathique.

Hétérogénéité de modèles génétiques

Cette notion recouvre deux aspects :

- la possibilité qu'à un locus déterminé des allèles puissent se comporter de manière dominante ou récessive pour un même phénotype. C'est le cas par exemple de certaines hémoglobinopathies correspondant à des allèles dominants et d'autres à des allèles récessifs au même locus β -globine ;
- cette notion recouvre une autre possibilité, à rapprocher de l'hétérogénéité génétique, puisqu'il s'agit de maladies identiques obéissant à des modèles d'hérédité différents suivant le locus concerné : par exemple, rétinopathies

pigmentaires autosomiques dominantes et autosomiques récessives liées à des loci indépendants.

Hétérogénéité génétique dans les modèles multigéniques et multifactoriels

Cette notion est citée ici pour mémoire du fait que le modèle multifactoriel n'exclut en rien ni l'hétérogénéité de locus ni l'hétérogénéité allélique. Bien au contraire, les données de séquençage de nouvelle génération des génomes de malades dans le cadre de pathologies multifactorielles communes devraient aller dans le sens d'une très grande variabilité des altérations génétiques en cause et, donc, d'une grande hétérogénéité de locus. Il peut s'agir de mutations héritées mais aussi de mutations *de novo* dans cette situation, comme dans l'exemple des phénotypes neuro-développementaux complexes du spectre épilepsies-déficits intellectuels-troubles autistiques. La notion d'hétérogénéité de locus dans le système multifactoriel se décline aussi quel que soit le modèle présumé :

- modèle multifactoriel combinant facteurs génétiques et facteurs de milieu ;
- modèle multigénique ;
- modèle mixte à locus majeur ;
- voire modèle digénique, format le plus élémentaire du modèle oligogénique, dans lequel la combinatoire de mutations à deux loci indépendants (non liés), chez le même individu, confère le phénotype qui ne se manifeste pas chez les individus hétérozygotes à un seul de ces deux loci.

ENTRAÎNEMENT 14 QCM

QCM 1

Indiquez les affirmations exactes parmi les propositions suivantes :

- A.** L'hétérogénéité allélique concerne une minorité des gènes dont les mutations conduisent à une maladie génétique mendélienne
- B.** L'hétérogénéité allélique complique la pratique des tests génétiques
- C.** L'hétérogénéité de locus implique la coexistence de mutations de gènes différents, chez un même individu, pour qu'une maladie génétique se manifeste
- D.** Les maladies géniques par mutations gain de fonction ont en général une hétérogénéité allélique réduite ou nulle
- E.** Il n'y a pas d'exemple de maladie monogénique attribuée à un seul allèle mutant majoritaire

QCM 2

Indiquez les affirmations exactes parmi les propositions suivantes :

- A.** Un hétérozygote composite est un individu *a priori* indemne de maladie génétique
- B.** Un double hétérozygote est un individu *a priori* atteint d'une maladie génétique
- C.** Une maladie génétiquement homogène (homogénéité de locus) préjuge d'un phénotype d'expression invariante
- D.** Un répertoire allélique important permet de former plutôt l'hypothèse d'un mécanisme perte de fonction des mutations en question dans une maladie monogénique
- E.** Dans une maladie sans hétérogénéité allélique, une variabilité interfamiliale suggère la possibilité de gènes modificateurs

Diagnostic prénatal et préimplantatoire

Cédric Le Caignec

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	168
Outils du diagnostic prénatal	168
Indications du diagnostic prénatal	171
Difficultés du diagnostic prénatal	173
Interruption médicale de grossesse	174
Diagnostic préimplantatoire	174
Indications du DPI	175
Techniques de DPI	175



L'essentiel à retenir

Le diagnostic prénatal (DPN) consiste à rechercher au cours de la grossesse une anomalie embryonnaire ou fœtale. Il peut être organisé en amont de la grossesse lorsqu'il existe un risque identifié dans la famille ou durant la grossesse (risque accru de trisomie 21, signes d'appel échographiques). La mise en évidence d'une anomalie d'une particulière gravité, incurable au moment du diagnostic peut conduire à une interruption pour motif médical de la grossesse à la demande des parents. Afin de réaliser un diagnostic génétique, trois principaux modes de prélèvement existent : la choriocentèse, l'amniocentèse et exceptionnellement la cordoncentèse. Ces prélèvements invasifs génèrent un risque de fausse couche de l'ordre de 0,1 à 1 %. Afin de limiter le nombre de perte fœtale, de nouvelles techniques sont en cours de développement utilisant l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Concernant les couples avec plusieurs récidives ou un risque élevé d'avoir un enfant porteur d'une anomalie d'une particulière gravité, il est possible d'avoir accès au diagnostic préimplantaire (DPI). Le DPI permet d'étudier le statut génétique des embryons à un stade précoce du développement d'une maladie donnée et de réimplanter uniquement les embryons sains.

Introduction

Le DPN consiste à rechercher au cours de la grossesse une anomalie embryonnaire ou fœtale. Lorsque le DPN conduit au diagnostic d'une maladie ayant une forte probabilité d'être d'une particulière gravité et incurable au moment du diagnostic, le couple peut demander une interruption de grossesse pour motif médical (IMG), faute d'une meilleure solution. Le rôle du médecin est d'accompagner le couple tout au long de la démarche de DPN. Dans ce contexte, la consultation de génétique est essentielle afin de délivrer au couple une information la plus complète possible. Lorsqu'une analyse génétique (chromosomique ou moléculaire) est prescrite à l'issue de cette consultation, un consentement autorisant le laboratoire à réaliser cette analyse génétique est signé par la femme enceinte. En parallèle, le prescripteur de l'analyse génétique signe une attestation de consultation de conseil génétique.

Les difficultés de prise de décision rencontrées en DPN ont justifié la mise en place réglementée de centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN), au nombre d'un,

parfois deux, par CHU ou CH. Chaque CPDPN comprend au moins un obstétricien, un échographiste, un pédiatre, un généticien, une conseillère en génétique, un fœtopathologiste et un psychiatre ou un psychologue. Les équipes des CPDPN accompagnent et conseillent les couples dans leur parcours. Elles ont, par ailleurs, pour mission de confirmer les indications, de délivrer des avis et conseils (diagnostic, thérapeutique et pronostic) aux cliniciens et biologistes en cas de suspicion d'affection d'un embryon ou d'un fœtus. La notion de « particulière gravité » d'une maladie y est souvent discutée. Chaque CPDPN se réunit habituellement une fois par semaine et statue sur les demandes d'IMG formulées par le couple.

Le DPN est encadré par plusieurs textes législatifs accessibles sur le site de l'Agence de la biomédecine (www.agence-biomedecine.fr).

Outils du diagnostic prénatal

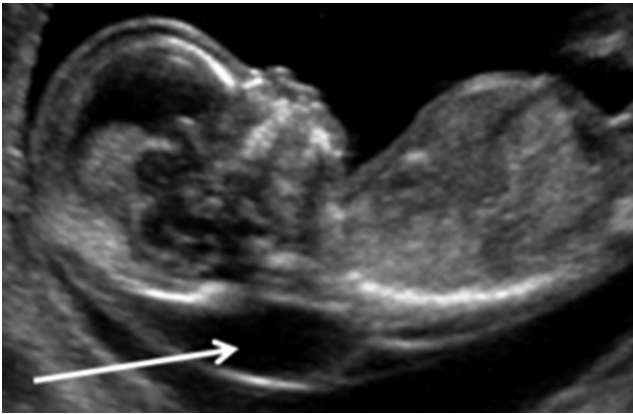
Deux types d'outils sont utilisés en DPN : les examens d'imagerie et les prélèvements de cellules ou tissus.

Imagerie

Échographie prénatale

L'échographie en deux dimensions (2D), et dans certains cas en 3D, est un examen essentiel au DPN. Elle permet d'effectuer des mesures et d'évaluer la morphologie et les mouvements du fœtus. Elle est une aide au diagnostic d'anomalies fœtales en lien avec une anomalie génétique ou non. Cet examen est particulièrement intéressant car il est non invasif c'est-à-dire qu'il ne présente pas de risque pour le fœtus et la mère. En revanche, il nécessite un équipement sophistiqué et un opérateur compétent. En France, trois échographies prénatales sont recommandées à toute femme enceinte : à 12 SA, à 22 SA et à 32 SA et permettent la détection d'anomalies variables selon le terme :

- l'échographie de 12 SA est essentielle pour la mesure de la clarté nucale. Cette dernière correspond à une image liquidienne rétro-nucale. La mesure est interprétée en fonction de la longueur crânio-caudale embryonnaire et doit être faite entre 11 et 13 semaines et 6 jours d'aménorrhée. À ce terme de la grossesse, la présence d'une clarté nucale fine est physiologique. En revanche, une épaisseur excessive de la clarté nucale (nuque épaisse) est évocatrice d'anomalie chromosomique, en particulier de syndrome de Turner et de trisomie 21 (figures 15.1 et 15.2). La mesure de la clarté nucale est un élément important dans le calcul de risque combiné du dépistage de la trisomie 21 ;

**Figure 15.1**

Nuque épaisse visualisée à l'échographie 2D de 12 SA évocateurs d'anomalie chromosomique dont la trisomie 21 et le syndrome de Turner.

Image : Dr Claudine Le Vaillant.

**Figure 15.2**

Nuque épaisse visualisée à l'échographie 3D de 12 SA évocateurs d'anomalie chromosomique dont la trisomie 21 et le syndrome de Turner.

Image : Dr Claudine Le Vaillant.

- l'échographie morphologique de 22 SA permet des mesures fines, la recherche de malformations et de signes plus subtils évocateurs d'une maladie chromosomique ou monogénique. Un retard de croissance intra-utérin sévère non expliqué par une cause vasculaire conduira à rechercher une anomalie chromosomique au caryotype. Dans cette situation, une analyse complémentaire par FISH est souvent demandée, en particulier à la recherche d'une microdélétion 4p16.3 responsable

du syndrome de Wolf-Hirschhorn. Une malformation évocatrice de trisomie 21 (une atrésie duodénale, un alignement des valves auriculo-ventriculaires suggérant une cardiopathie à type de canal atrioventriculaire [e-figure 15.3]) est recherchée lors de cette échographie. En dehors de ces signes majeurs, des petits signes évocateurs de trisomie 21 sont également dépistés à l'échographie de 22 SA. Par exemple, une longueur fémorale et une longueur des os propres du nez inférieure à la moyenne (OPN courts) (e-figure 15.4), une interposition linguale (e-figures 15.4 et 15.5), une brachyclinodactylie (e-figure 15.6), des oreilles bas implantées en rotation postérieure (e-figure 15.7) ou une brachycéphalie;

- l'échographie de 32 SA conduit également à la découverte tardive de signes évocateurs d'une maladie génétique. Compte tenu du terme avancé de la grossesse, lorsqu'une analyse génétique est demandée, celle-ci doit être réalisée, lorsque cela est possible, avant culture cellulaire de façon à obtenir un résultat rapide avant un éventuel accouchement prématuré. Par exemple, la suspicion d'une trisomie 21 à ce terme de la grossesse conduit à réaliser une FISH interphasique avec une sonde ciblant le chromosome 21 et permet un résultat rapide en 24–48 heures.

Radiographies squelettiques et scanner hélicoïdal

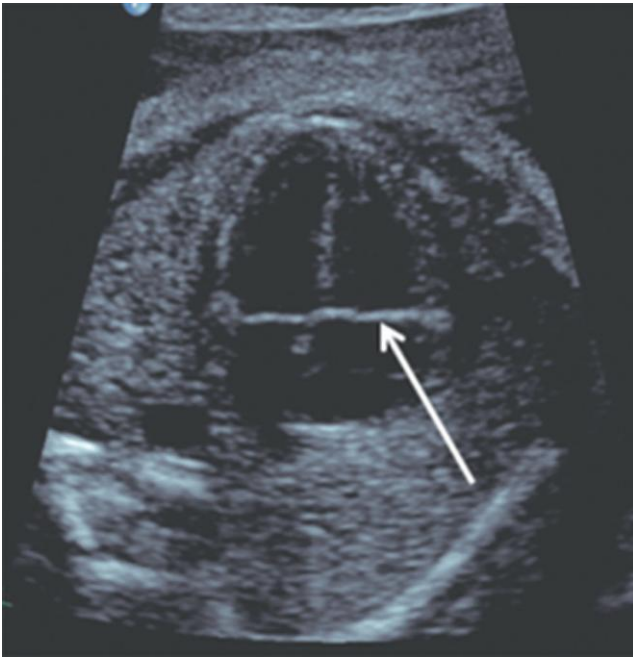
Les radiographies du squelette, appelées contenu utérin, sont réalisées à partir de 26 SA. Elles aident au diagnostic de maladies osseuses en évaluant la qualité de la trame osseuse, la présence de fractures ou de signes de chondrodysplasie. Le scanner hélicoïdal permet une étude du squelette fœtal avec reconstruction en 2D ou 3D et remplace parfois le contenu utérin mais sans conséquence pour le fœtus.

Imagerie par résonance magnétique nucléaire

L'IRM cérébrale est réalisée après 30 SA et permet de rechercher des anomalies de la morphologie et de la gyration cérébrale.

Prélèvements de cellules et tissus

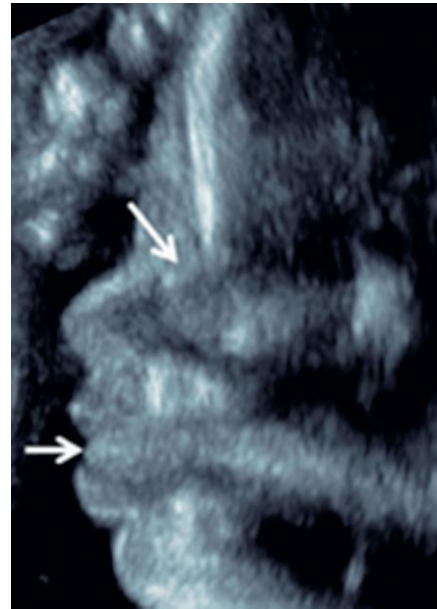
Plusieurs méthodes de prélèvement sont utilisées dans le DPN de maladies monogéniques ou chromosomiques. Ces méthodes de prélèvements sont dites invasives lorsqu'elles présentent un risque pour la femme ou pour le fœtus, principalement un risque de fausse couche.



e-figure 15.3

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant un alignement des valves auriculo-ventriculaires suggérant une cardiopathie à type de canal atrioventriculaire chez un fœtus trisomique 21.

Image : Dr Claudine Le Vaillant.



e-figure 15.4

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant une interposition linguale (flèche du bas) et des os propres du nez courts (flèche du haut), évocateurs de trisomie 21.

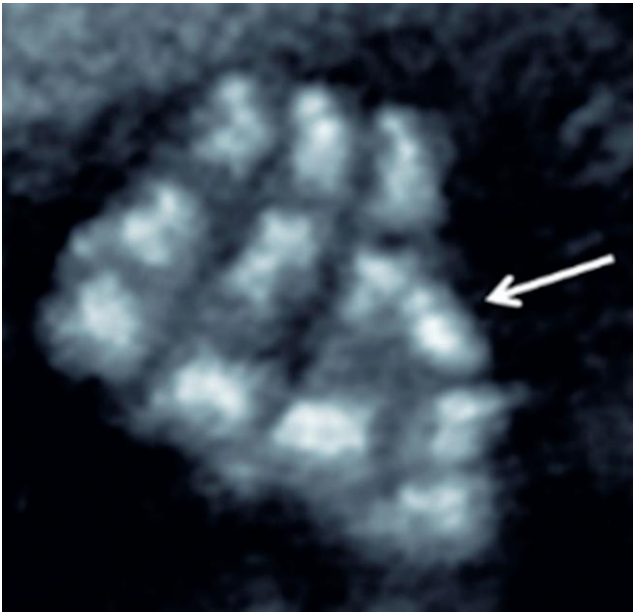
Image : Dr Claudine Le Vaillant.



e-figure 15.5

Image échographique 3D réalisée à 22 SA montrant une interposition linguale évocatrice de trisomie 21.

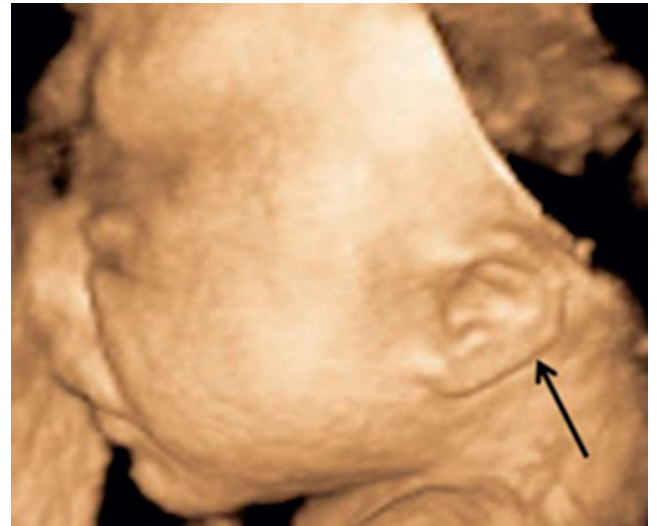
Image : Dr Claudine Le Vaillant.



e-figure 15.6

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant une clinodactylie du 5^e doigt évocatrice de trisomie 21.

Image : Dr Claudine Le Vaillant.



e-figure 15.7

Image échographique 3D réalisée à 22 SA montrant une oreille bas implantée en rotation postérieure évocatrice de trisomie 21.

Image : Dr Claudine Le Vaillant.

Amniocentèse

L'amniocentèse est un examen consistant à aspirer du liquide amniotique (en général un volume de 10 à 20 mL) grâce à une ponction transabdominale sous contrôle échographique. Cet examen est généralement réalisé à partir de 15 SA et est possible jusqu'au terme. Le risque de fausse couche secondaire à l'amniocentèse est estimé à environ 0,1 %. Le liquide amniotique ponctionné est centrifugé de façon à séparer le culot cellulaire du surnageant. Le surnageant peut être utilisé dans le DPN des anomalies du tube neural grâce au dosage de l' α -foetoprotéine et dans certaines maladies métaboliques grâce au dosage de certains métabolites. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture avec du sérum de veau fœtal, de façon à stimuler la croissance cellulaire. La plupart des cellules en suspension dans le liquide amniotique, issues de l'amnios, de la peau et du tractus urinaire fœtal, sont non viables. Cependant, une faible fraction de ces cellules est viable et poussera après mise en culture. Après 7 à 14 jours de culture, le nombre de cellules est suffisant pour une analyse chromosomique ou moléculaire. Dans certaines situations à haut risque d'aneuploidie (par exemple en présence de signes d'appel échographique), une FISH interphasique ciblée sur les chromosomes 13, 18, 21, X et Y est réalisée de façon à obtenir un résultat rapide en 24–48 heures, sans passer par une étape de culture préalable. Des techniques de génétique moléculaire basées sur la PCR permettent dans certains cas un diagnostic direct, également sans étape de culture préalable.

Trophocentèse

La trophocentèse est également appelée biopsie de trophoblaste ou biopsie de villosités chorales. À la différence de l'amniocentèse, la trophocentèse peut être réalisée au cours du premier trimestre de la grossesse, dès 11 SA, ce qui permet d'avoir un résultat précoce au cours de la grossesse. Dans la majorité des cas, elle est réalisée entre 11 et 13 SA sous contrôle échographique, généralement par voie transabdominale, plus rarement par voie transvaginale. Le risque de fausse couche lié à la biopsie de trophoblaste a longtemps été considéré comme légèrement supérieur – 1 à 2 % – à celui de l'amniocentèse. L'estimation de ce risque est encore controversée mais il semblerait que lorsque la biopsie de trophoblaste est réalisée par une personne expérimentée, le risque est plutôt estimé à environ 0,5 %.

L'analyse chromosomique sur villosités chorales est faite en deux temps. Une partie du prélèvement est utilisée pour l'analyse directe, c'est-à-dire dès la réception du prélèvement, sans culture préalable. Cet examen direct est possible car certaines

cellules du trophoblaste (les cellules du syncytiotrophoblaste) se divisent spontanément, permettant l'obtention de métaphases et l'établissement du caryotype en 24–48 heures. Le caryotype réalisé à l'examen direct est parfois remplacé par une analyse par FISH interphasique ou par une technique de PCR semi-quantitative ciblée sur certains chromosomes. Les principaux chromosomes responsables des aneuploïdies les plus fréquentes sont testés, par exemple les chromosomes 13, 18, 21, X et Y. Quelle que soit la méthode utilisée avant culture, le résultat de l'examen direct est complété par un caryotype réalisé après culture cellulaire. Les cellules obtenues après culture proviennent de l'axe mésenchymateux des villosités chorales et sont embryologiquement plus proches de celles du fœtus que les cellules du syncytiotrophoblaste. Le résultat final du caryotype est une synthèse des résultats obtenus avant et après culture. Dans de rares cas, il existe une discordance entre les résultats de l'analyse chromosomique obtenue à l'examen direct et à la culture. Dans cette situation, un second caryotype après amniocentèse peut être nécessaire pour clarifier l'analyse chromosomique.

Pour un DPN d'une maladie monogénique, la quantité d'ADN obtenue à l'issue du prélèvement, sans culture préalable, est généralement suffisante pour une analyse de génétique moléculaire. Dans de rares cas, la technique nécessite une quantité d'ADN plus importante comme par exemple pour réaliser une technique de *Southern blot* dans le cadre d'un diagnostic de maladie d'X fragile et une culture peut se révéler nécessaire.

Ponction de sang fœtal

L'échographie permet la visualisation des vaisseaux du cordon ombilical et ainsi une ponction de sang fœtal à partir de 20 SA. Cette ponction de sang fœtal peut être réalisée pour préciser une anomalie chromosomique identifiée à la biopsie de trophoblaste ou à l'amniocentèse. Elle est également réalisée pour une détermination du rhésus fœtal, pour rechercher une anomalie hématologique ou pour explorer la fonction rénale. Le risque de fausse couche secondaire à une ponction de sang fœtal est estimé à environ 2 %.

Diagnostic de sexe ou de rhésus fœtal sur sang maternel

Une prise de sang maternel permet de déterminer le sexe fœtal à partir de 6 SA par la détection de séquences d'ADN spécifiques du chromosome Y. Ces séquences proviennent de cellules trophoblastiques qui passent la barrière placentaire. Les cellules sont lysées et libèrent leur ADN dans le sang maternel, appelé alors ADN fœtal circulant. La détermination du sexe fœtal sur sang maternel est sou-

vent réalisée lorsque le couple est à risque de transmettre une maladie récessive liée à l'X. Si la prise de sang maternel indique que l'embryon est de sexe masculin, un DPN après trophocentèse ou amniocentèse sera réalisé afin de savoir si l'embryon ou le fœtus est atteint de la maladie. À l'inverse, si l'embryon est de sexe féminin, le DPN ne sera pas réalisé car celui-ci sera indemne de la pathologie, conducteur ou non. Il est également possible de déterminer le rhésus fœtal D sur sang maternel afin de prévenir une éventuelle allo-immunisation fœto-maternelle. Le risque d'allo-immunisation existe si le fœtus est rhésus D positif (RhD+) et la mère rhésus D négatif (RhD-). L'allo-immunisation fœto-maternelle se caractérise par la production d'anticorps maternels dirigés contre les hématies du fœtus. Elle peut être à l'origine d'anémies fœtales et néonatales sévères ainsi que d'ictères néonataux graves. Le facteur étiologique principal est le passage de sang fœtal dans la circulation maternelle, lors d'une précédente grossesse au moment de l'accouchement, d'une fausse couche ou de la réalisation d'un geste invasif.

Indications du diagnostic prénatal

Dépistage de la trisomie 21

Plusieurs méthodes de dépistage prénatal permettent une estimation du risque de trisomie 21. Lorsque le dépistage conduit à suspecter une trisomie 21, celui-ci doit être confirmé par un examen de diagnostic, c'est-à-dire en général par le caryotype fœtal.

Dépistage combiné de la trisomie 21 au premier trimestre

Une estimation du risque de trisomie 21 au cours d'une grossesse peut être obtenue grâce au dépistage combiné de la trisomie 21 au premier trimestre. Cette méthode de dépistage est actuellement celle recommandée par la Haute Autorité de santé. Un logiciel permet le calcul de cette estimation de risque à partir de trois paramètres : la mesure de la clarté nucale corrélée à la longueur crânio-caudale embryonnaire, l'âge maternel et le dosage d'hormones dans le sang maternel. Au premier trimestre de la grossesse, deux hormones sont dosées dans le sang maternel : l'hormone chorionique gonadotrope libre (β -hCG) et la *pregnancy-associated plasma protein A* (PAPP-A). En cas de trisomie 21, le taux de β -hCG libre sérique maternel est souvent supérieur à la moyenne tandis que le taux de PAPP-A sérique maternel

est souvent inférieur à la moyenne. Lorsque le risque estimé est inférieur à 1/250, la femme enceinte est placée dans le groupe à faible risque et le dépistage combiné ne conduit pas à proposer de prélèvement invasif. À l'inverse, lorsque le risque estimé est supérieur à 1/250, la femme enceinte est placée dans le groupe à risque de trisomie 21. Ce résultat conduit à lui proposer un prélèvement invasif pour confirmer l'anomalie chromosomique ou au contraire l'exclure. La pertinence du dépistage combiné de la trisomie 21 au premier trimestre est actuellement discutée en raison des taux de faux positifs et de faux négatifs relativement élevés. En effet, les faux négatifs de ce dépistage expliquent environ la moitié des enfants trisomiques 21 nés en France actuellement. L'émergence du DPNI fait rediscuter la place de ce test dans le dépistage de la trisomie 21.

Marqueurs sériques du deuxième trimestre et dépistage séquentiel intégré du deuxième trimestre de la trisomie 21

Lorsque le dépistage combiné de la trisomie 21 au premier trimestre n'a pas été réalisé, un dépistage séquentiel intégré peut être réalisé au deuxième trimestre. Une prise de sang maternelle permet le dosage de deux hormones : la β -hCG et l' α -fœtoprotéine. En cas de trisomie 21, le taux de β -hCG libre sérique maternel est souvent supérieur à la moyenne tandis que le taux d' α -fœtoprotéine sérique maternel est souvent inférieur à la moyenne. Si la mesure de la clarté nucale a été effectuée au premier trimestre, un calcul de risque séquentiel intégré du deuxième trimestre peut être réalisé. Un âge maternel avancé seul n'est plus une indication de DPN par technique de prélèvement invasif et n'est donc plus pris en charge par l'assurance maladie.

Dépistage prénatal non invasif (DPNI) de la trisomie 21

Il est actuellement possible de réaliser un dépistage de la trisomie 21 à partir d'une prise de sang maternel en analysant l'ADN fœtal circulant présent dans le sang maternel. En effet, des cellules du trophoblaste passent la barrière placentaire et sont ainsi présentes dans le sang maternel. Ces cellules sont lysées, l'ADN ainsi libéré dans le plasma est appelé ADN fœtal circulant. Si le fœtus est atteint de trisomie 21, les cellules du trophoblaste sont en général également trisomiques 21. Cependant, le sang maternel contient également de l'ADN maternel circulant. La répartition de l'ADN fœtal et de l'ADN maternel circulants est respectivement de 10 % et de 90 %. Toute la difficulté consiste à détecter la surreprésentation des séquences d'ADN du chromosome 21 issues de l'ADN fœtal

circulant au sein de l'ADN maternel circulant majoritaire. Les nouvelles techniques haut débit de séquençage massif parallèle permettent aujourd'hui de détecter cette faible surreprésentation des séquences d'ADN du chromosome 21 en cas de trisomie 21. Les valeurs prédictives positive et négative de cette méthode de dépistage sont excellentes, bien supérieures à celle du dépistage combiné de la trisomie 21. En cas de dépistage positif de trisomie 21 par DPNI, il est actuellement recommandé de confirmer le diagnostic par un caryotype fœtal. Une amniocentèse est préférable à une biopsie de trophoblaste car le caryotype sera établi à partir des cellules fœtales et non placentaires et permettra donc de s'affranchir d'une éventuelle trisomie 21 confinée au placenta. Compte tenu des excellentes valeurs prédictives positive et négative de cette méthode, le nombre de faux positifs, et par conséquent de fausse couche secondaire au prélèvement invasif de confirmation, est largement diminué comparé aux méthodes de dépistage traditionnelles. Cette méthode permet aussi le dépistage de la trisomie 13 et, pour le moment avec une moindre fiabilité, celui de la trisomie 18.

Antécédent familial d'anomalie chromosomique

Un couple dont l'un des deux membres est porteur d'une anomalie à l'état équilibré peut être à risque de transmettre l'anomalie à un enfant à l'état déséquilibré. Le risque dépendra du type d'anomalie chromosomique, des chromosomes impliqués et du parent porteur. Ainsi, le risque sera différent selon qu'il s'agit d'une inversion chromosomique ou d'une translocation robertsonienne ou réciproque. Une trisomie 21 peut résulter du déséquilibre d'une translocation robertsonienne parentale équilibrée impliquant un chromosome 21. Dans le cas d'une translocation robertsonienne entre un chromosome 14 et un chromosome 21 portée par la mère à l'état équilibré, le risque de trisomie 21 est d'environ 15 %. Ce risque justifie de proposer au couple un DPN pour caryotype fœtal.

Antécédent d'enfant avec une anomalie chromosomique *de novo*

Le diagnostic d'une anomalie chromosomique *de novo* chez un enfant ou un fœtus est généralement associé à un faible risque de récurrence. Cet antécédent peut cependant conduire à la réalisation d'un DPN à la demande du couple afin d'éliminer tout risque lié à cet antécédent en particulier en raison d'une mosaïque germinale. Une situation discutée est la présence

d'un antécédent de trisomie 21 libre et homogène. Le risque de récurrence est estimé à 1 % et corrélé à l'âge maternel.

Histoire familiale de maladie monogénique

Un couple à risque d'avoir un enfant atteint d'une maladie monogénique grave justifie la réalisation d'un DPN par technique de génétique moléculaire à la suite d'un prélèvement prénatal invasif. Les situations les plus fréquemment rencontrées sont :

- l'un des deux parents est atteint d'une maladie autosomique dominante et a un risque sur deux de transmettre la maladie;
- les parents sont sains mais porteurs à l'état hétérozygote d'une mutation pour une maladie autosomique récessive. Le couple a un risque sur quatre d'avoir un enfant atteint;
- la femme est conductrice saine d'une maladie récessive liée à l'X. Un garçon sur deux sera atteint de la maladie tandis que toutes les filles seront saines et une sur deux sera conductrice.

Histoire familiale d'une malformation congénitale

Un antécédent familial de malformation congénitale peut conférer un risque de récurrence de cette malformation supérieur à la population générale et ainsi peut justifier un DPN par échographie. Les principales malformations sont cérébrales, cardiaques, rénales ou squelettiques. Par exemple, un couple ayant un enfant avec malformation cardiaque isolée a un risque supérieur à la population générale d'avoir un second enfant également atteint d'une malformation cardiaque. L'échographie prénatale réalisée à 22 SA sera particulièrement importante pour détecter la présence ou non d'une éventuelle cardiopathie et, le cas échéant, pour préciser sa sévérité. Une attention particulière est portée à l'organe potentiellement mal formé et justifie souvent le recours à un spécialiste de cet organe.

Antécédent de déficience intellectuelle

Un couple dont la femme est enceinte ayant un précédent enfant ou un apparenté avec déficience intellectuelle peut être adressé pour DPN. Jusqu'à récemment, un caryotype et une recherche d'X fragile étaient réalisés chez la personne avec déficience intellectuelle. Actuellement, une analyse chromosomique par puce à ADN peut être réalisée chez

le cas index à la recherche d'un déséquilibre génomique expliquant la déficience intellectuelle. En cas d'anomalie identifiée chez le cas index, celle-ci pourra être recherchée chez la femme enceinte ou le fœtus. Cette nouvelle technique nécessite une organisation particulière du laboratoire de façon à rendre un résultat dans des délais acceptables.

Difficultés du diagnostic prénatal

Le résultat d'un diagnostic prénatal est souvent sans ambiguïté. Cependant, dans certains cas, des difficultés d'interprétation peuvent se poser. Des difficultés peuvent également être rencontrées en cas d'échec technique ou lorsqu'un résultat sans rapport avec l'indication initiale est obtenu.

Résultat chromosomique ambigu après biopsie de trophoblaste

Dans environ 1 % des cas, une biopsie de trophoblaste met en évidence une mosaïque chromosomique, c'est-à-dire la présence d'au moins deux populations cellulaires avec des constitutions chromosomiques différentes. Différentes situations conduisent à ce type d'anomalie :

- le prélèvement est contaminé par des cellules maternelles. Lorsqu'une première population de cellules est XX et l'autre XY, une contamination maternelle est la première explication à envisager. En revanche, lorsque les deux populations cellulaires sont XX, par exemple, l'une 47,XX,+21 et l'autre 46,XX, il peut s'agir d'une contamination maternelle ou d'une vraie trisomie 21 en mosaïque. Une recherche de contamination maternelle doit être effectuée à l'aide de marqueurs microsatellites polymorphes (*short tandem repeat*, STR) en comparant le profil de marqueurs de l'embryon ou du fœtus avec celui de la mère ;
- la mosaïque est un artéfact de culture. Habituellement, plusieurs cultures indépendantes sont réalisées pour identifier ce problème rapidement. Si la mosaïque est présente sur une seule culture, il s'agit probablement d'un artéfact de culture et non d'un mosaïcisme fœtal vrai ;
- la mosaïque confinée au placenta. Dans ce cas, la mosaïque est limitée à une portion du placenta. L'anomalie chromosomique apparaît au cours d'une division cellulaire mitotique au moment de la formation du placenta et n'est pas présente chez le fœtus ;
- il s'agit d'une mosaïque fœtale vraie. Le phénotype résultant de la mosaïque est souvent difficile à prédire et peut rendre le conseil génétique particulièrement délicat. Une ponction de sang fœtal peut dans certains cas être discutée

mais, de toutes les façons, cette analyse complémentaire ne clarifie pas toutes les situations car elle ne permet que l'analyse d'un seul tissu supplémentaire. Quelle que soit la décision prise par les parents, il est important de réaliser le caryotype sur plusieurs tissus (sang, peau, placenta) après la naissance ou l'IMG pour interpréter les résultats obtenus en prénatal de façon à donner un conseil génétique pertinent lors d'une prochaine grossesse.

Découverte d'un remaniement chromosomique en apparence équilibré

Une difficulté du DPN est la découverte d'un remaniement chromosomique en apparence équilibré, tel qu'une inversion ou une translocation réciproque. Si l'analyse parentale indique que le remaniement chromosomique est présent chez l'un des parents, ceux-ci peuvent être rassurés, il est très probable que ce remaniement ait été transmis à l'identique et soit sans conséquence pour le fœtus. En revanche, si la translocation réciproque est absente chez les parents, c'est-à-dire *de novo*, il y a un risque d'environ 6 % que le fœtus présente une ou des malformations(s) et par la suite une déficience intellectuelle. Les études de CGH-array ont montré qu'en présence d'une translocation réciproque en apparence équilibrée, il pouvait exister un microdéséquilibre (i.e. microdélétion ou microduplication) au point de cassure. Ce microremaniement au point de cassure est trop petit pour être visible au caryotype standard, c'est la raison pour laquelle on parle de translocation en apparence équilibrée. Il est également possible qu'un gène soit interrompu à l'un des points de cassure ou au deux. Dans ce cas, l'analyse par CGH-array ne détectera pas d'anomalie. Le conseil génétique est particulièrement délicat dans ces situations de translocation réciproque *de novo* équilibrée à la CGH-array. Une échographie normale est un élément rassurant tandis que la mise en évidence de signe d'appel échographique peut orienter vers une IMG.

Découverte d'un marqueur chromosomique surnuméraire

Une autre difficulté est liée à l'identification au caryotype prénatal d'un marqueur chromosomique surnuméraire, c'est-à-dire d'un chromosome supplémentaire de petite taille dont l'origine ne peut être précisée au caryotype. Si l'analyse parentale indique que le marqueur chromosomique est présent chez l'un des parents au phénotype normal, ceux-ci peuvent être rassurés, il est très probable que

ce marqueur chromosomique soit sans conséquence chez le fœtus. En revanche, si le marqueur chromosomique est absent chez les parents, c'est-à-dire *de novo*, il y a un risque que le fœtus présente une ou des malformations(s) et par la suite une déficience intellectuelle. En cas de marqueur chromosomique *de novo*, il est recommandé de réaliser une CGH-array afin de préciser si le marqueur chromosomique contient du matériel euchromatique, c'est-à-dire des gènes ou au contraire est constitué uniquement de matériel hétérochromatique, par exemple de séquences répétées centromériques. Un marqueur chromosomique contenant uniquement du matériel hétérochromatique est de bon pronostic tandis qu'un marqueur chromosomique contenant de l'euchromatine aura un pronostic plus incertain. Le pronostic pourra être précisé dans une certaine mesure par les gènes impliqués, le nombre de gènes et la présence ou non de signes d'appel échographique.

Découverte fortuite d'une anomalie chromosomique

Le caryotype prénatal est souvent réalisé dans le cadre du dépistage de la trisomie 21, en particulier à la suite du dépistage combiné au premier trimestre. Dans ce contexte, il arrive que le fœtus ne soit pas atteint de trisomie 21 mais qu'une autre anomalie chromosomique sans rapport avec l'indication initiale soit identifiée. Il est essentiel que les couples soient informés de cette éventualité au moment de la signature du consentement avant le prélèvement. Cette découverte fortuite intéresse le plus souvent un gonosome. Le pronostic de ces dysgonosomies est parfois difficile à établir car les capacités cognitives varient d'un sujet à l'autre. Les principales dysgonosomies détectées de façon fortuite en prénatal sont les suivantes : 47,XXY, 47,XXX et 47,YYY. Un conseil génétique détaillé et objectif est essentiel pour permettre au couple de prendre la décision de poursuivre la grossesse ou au contraire de l'interrompre. Les progrès dans la prise en charge médicale des patients porteurs de ces dysgonosomies et un bon conseil génétique ont conduit à une diminution significative des demandes d'IMG dans ces situations.

Interruption médicale de grossesse

Les possibilités de recours à une IMG dépendent de la législation en vigueur de chaque pays. En France, un couple peut y avoir recours lorsqu'il existe une forte probabilité

que l'enfant à naître soit atteint d'une maladie d'une particulière gravité et incurable au moment du diagnostic. La demande d'IMG doit être validée par un CPDPN quel que soit le terme de la grossesse. Selon le terme de la grossesse auquel l'autorisation d'IMG a été obtenue, une aspiration sera pratiquée ou le déclenchement d'un accouchement.

Diagnostic préimplantatoire

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) consiste à rechercher sur des embryons obtenus par fécondation *in vitro* une maladie génétique (chromosomique ou moléculaire) qui peut être transmise par les parents. Les maladies entrant dans le champ du DPI sont celles ayant une forte probabilité d'être d'une particulière gravité et incurable au moment du diagnostic. Le DPI représente donc une alternative au DPN, la maladie génétique est recherchée sur les embryons issus de la procédure de FIV et non chez le fœtus. Cette procédure permet de s'affranchir d'un éventuel recours à l'IMG. La maladie génétique a pu être découverte lors de la naissance d'un enfant atteint, au cours d'une grossesse ou parfois à l'occasion d'un bilan d'infertilité.

L'activité de DPI est encadrée par la loi (article R.2131 du *Code de la santé publique* en particulier). Celle-ci précise les éléments suivants :

- la réalisation d'un diagnostic biologique à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro* ne peut intervenir que si le couple remplit les conditions nécessaires à la mise en œuvre d'une assistance médicale à la procréation (couple, vivant, en âge de procréer). En France, l'AMP est régie par la loi de bioéthique de juillet 2011 qui précise que « L'assistance médicale à la procréation a pour objet de remédier à l'infertilité d'un couple ou d'éviter la transmission à l'enfant ou à un membre du couple d'une maladie d'une particulière gravité. » ;
- l'indication de recourir au DPI fait l'objet d'une attestation établie après concertation au sein d'un CPDPN. Le couple est informé que seule la pathologie liée à l'anomalie génétique parentale susceptible d'être transmise peut être recherchée chez l'embryon au cours des analyses conduisant à ce diagnostic. Par exemple, lorsqu'un DPI pour mucoviscidose est réalisé, seule cette maladie est recherchée, la loi interdit toute autre analyse, y compris la recherche d'une trisomie 21 ;
- le DPI est pratiqué exclusivement dans les centres autorisés par des praticiens agréés pour cette activité. Il en existe quatre en France : Paris (Necker-Clamart), Strasbourg, Montpellier et Nantes.

Indications du DPI

Quatre types d'indications relèvent du DPI : le DPI chromosomique, le DPI moléculaire, le diagnostic de sexe dans le cadre d'une maladie liée à l'X et le DPI associé au typage HLA.

Indications du DPI chromosomique

Les deux principaux types de remaniements cytogénétiques conduisant à une prise en charge en DPI chromosomique sont les translocations réciproques et robertsoniennes. La translocation robertsonienne entre les chromosomes 13 et 14 est la plus fréquente chez l'homme et la première indication de DPI chromosomique. Certaines inversions péri-centriques, microdélétions ou microduplications peuvent également faire l'objet d'un DPI chromosomique.

Indications du DPI moléculaire

Toute maladie monogénique ayant une forte probabilité d'être d'une particulière gravité et incurable au moment du diagnostic peut être éligible au DPI moléculaire. Les plus fréquemment prises en charge sont la mucoviscidose, la myotonie de Steinert, la myopathie de Duchenne, le syndrome de l'X fragile, la chorée de Huntington. La liste mise à jour des pathologies prises en charge dans les quatre centres de DPI français peut être retrouvée sur le site Internet de l'Agence de la biomédecine. De la même manière que pour le DPN, il n'existe pas de liste définie de maladie justifiant un DPI moléculaire ; le nombre de maladies prises en charge évolue avec le temps.

Diagnostic de sexe dans le cadre d'une maladie récessive liée à l'X

Un diagnostic de sexe peut être proposé dans certaines situations de maladie récessive liée à l'X. Dans ces cas, seuls les embryons féminins seront transférés car ceux-ci seront soit non porteurs de la mutation, soit porteurs mais au phénotype normal. Par exemple, lorsque le gène en cause dans une famille donnée est connu mais que la mutation familiale n'est pas identifiée, un diagnostic de sexe peut être proposé. Cette stratégie soulève des questions éthiques car des embryons masculins potentiellement sains seront considérés comme non transférables.

DPI associé au typage HLA ou DPI-HLA

Le DPI, associé au typage HLA, a pour objectif de permettre la conception d'un enfant indemne de la maladie génétique familiale qui a atteint son aîné(e) et susceptible de soigner cet aîné(e) malade de façon définitive grâce aux cellules-souches du sang placentaire prélevé dans le cordon ombilical ou, plus tard, de la moelle osseuse. Cette procédure est également appelée « bébé du double espoir » ou improprement « bébé médicament ». Plusieurs maladies monogéniques relèvent de cette procédure, souvent des maladies hématologiques, par exemple, l'anémie de Fanconi ou une thalassémie majeure. La finalité du DPI étant d'obtenir un enfant indemne de la maladie génétique familiale, la possibilité de permettre une greffe de cordon ombilical ou de moelle osseuse est envisagée mais n'est pas une condition à la réalisation d'un DPI-HLA. Ainsi, dans le cas où seuls des embryons indemnes de la maladie familiale seraient transférables mais qu'aucun ne serait également HLA compatible, la procédure prévoit le transfert d'un embryon indemne de la maladie. Dans ce cas, il ne pourra pas être réalisé de greffe de cordon à l'aîné. En France, seul le centre de DPI de Necker-Clamart dispose de l'agrément spécifique permettant de répondre aux demandes de DPI-HLA.

Techniques de DPI

Procédure de FIV

Après stimulation ovarienne, les ovaires de la femme demandeuse sont ponctionnés de façon à obtenir le plus d'ovocytes possible. Chaque ovocyte est ensuite fécondé avec un spermatozoïde de son conjoint. Cette fécondation se fait en général par injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde (FIV-ICSI). Au 3^e jour de développement embryonnaire, chaque embryon est constitué de 8 cellules ou blastomères en moyenne. Une (ou deux) cellule(s) par embryon est (sont) biopsiée(s) pour permettre le diagnostic génétique. À l'issue de cette analyse, un (ou parfois deux) embryon indemne de la maladie génétique familiale est transféré dans l'utérus.

Méthodes d'analyse génétique du DPI

Méthodes d'analyse génétique du DPI moléculaire

Diagnostic indirect et diagnostic direct

Le DPI moléculaire est basé sur des méthodes de PCR avec analyse de fragments. L'utilisation d'un panel de marqueurs microsatellites polymorphes (STR, pour *short tandem*

repeats) permet la réalisation d'un diagnostic indirect (voir chapitre 10, «Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène») (e-figure 15.8). Ce diagnostic indirect nécessite de disposer de prélèvements du couple et d'apparentés (un enfant du couple ou bien les parents du couple) afin de reconstituer les haplotypes de la région génomique contenant le gène muté dans une famille donnée.

Lorsque la/les mutation(s) familiale(s) est/sont identifiée(s), un diagnostic direct, c'est-à-dire la détection de la mutation elle-même, complète le diagnostic indirect. Selon le type de mutation, la technique utilisée est soit une analyse de fragment, soit la méthode de mini-séquençage. La méthode de séquençage Sanger n'est habituellement pas utilisée sur cellule unique en DPI (e-figure 15.8).

Difficultés du DPI moléculaire

Le DPI moléculaire nécessite une mise au point propre à chaque famille. Cette mise au point est une étape cruciale pour permettre un diagnostic le plus fiable possible. Cependant, malgré toutes les précautions prises, la fiabilité du DPI n'est pas de 100 %. Le généticien doit expliquer les limites du DPI et discuter un possible DPN sur la grossesse obtenue après le DPI avant de débiter la procédure de DPI.

Risque de perte d'un allèle (*allele drop-out*)

Le fait d'amplifier une seule cellule limite la fiabilité de l'analyse génétique du DPI moléculaire. En effet, les premiers cycles de PCR peuvent conduire à la non-amplification d'un des deux allèles (*allele drop-out*). Cette perte d'un des deux allèles peut concerner un marqueur microsatellite polymorphe ou une mutation causale. Cette difficulté technique explique qu'un diagnostic indirect avec au moins un marqueur polymorphe de chaque côté de la mutation et à moins de 1 Mb de celle-ci soit nécessaire. Dans la mesure du possible, il est souhaitable d'utiliser plusieurs marqueurs de chaque côté de la mutation. Le risque de perte d'un allèle explique que le DPI ne peut pas être basé sur la seule détection de la mutation en diagnostic direct.

Risque de contamination

La présence de produits de PCR amplifiés au fil des mois ou années précédentes représente le principal risque de contamination. De multiples précautions sont prises pour diminuer ce risque de contamination.

Limite de l'informativité des marqueurs polymorphes

Le diagnostic indirect est basé sur l'informativité des marqueurs polymorphes des différentes personnes de la famille étudiée. Cette informativité pour une famille donnée peut être insuffisante pour permettre un diagnostic fiable et conduire à récuser un DPI.

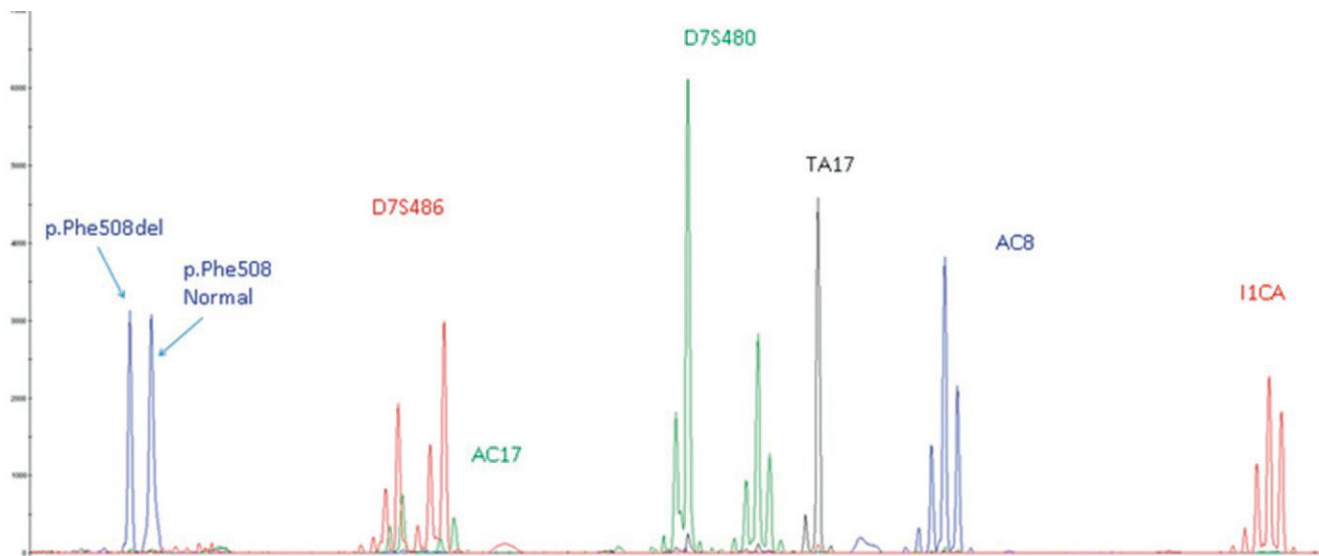
Méthodes d'analyse génétique du DPI chromosomique

La technique de DPI chromosomique fait appel à la FISH interphasique. Dans le cas d'une translocation robertsonienne, deux sondes au minimum, marquées de deux couleurs différentes, sont nécessaires pour distinguer les embryons équilibrés des embryons déséquilibrés selon différents modes de ségrégation. L'analyse FISH étant faite en interphase, il n'est pas possible de distinguer un embryon porteur de la translocation à l'état équilibré d'un embryon non porteur de la translocation. Dans le cas d'une translocation réciproque, trois sondes au minimum, marquées de trois couleurs différentes, sont nécessaires (e-figure 15.9).

Une limite du DPI cytogénétique est la présence d'une mosaïque chromosomique. La ou les cellules analysées peuvent avoir une constitution chromosomique normale tandis que les autres cellules embryonnaires, non testées, peuvent être anormales.

Bibliographie

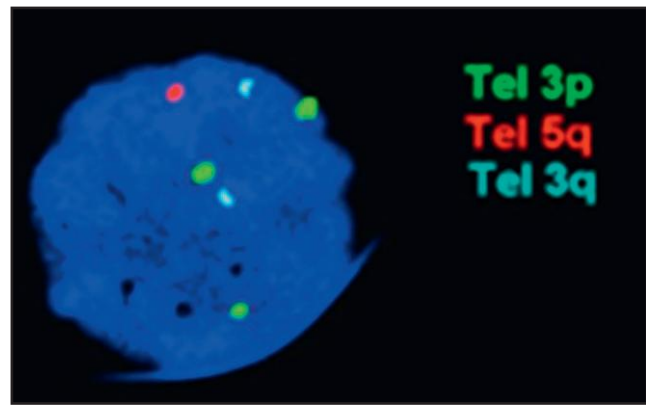
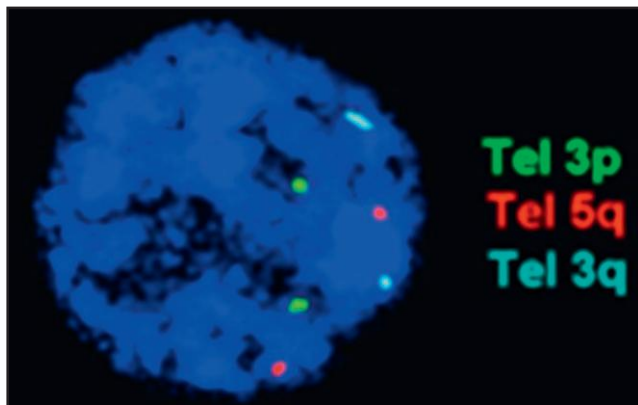
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet* 2005; 42 : 8–16.
- McKinlay Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. In : 3rd ed Oxford : Oxford University Press; 2003.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis : clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 1991; 49 : 995–1013.



e-figure 15.8

Méthodes directe et indirecte d'un diagnostic moléculaire préimplantatoire pour mucoviscidose chez un couple dont chaque membre est hétérozygote pour une mutation p.Phe508del.

Le diagnostic indirect est basé sur l'analyse de marqueurs génétiques polymorphes (STR). Dans cet exemple, six marqueurs génétiques polymorphes sont utilisés (D7S486, AC17, D7S480, TA17, AC8, I1CA). Le profil indique que cette cellule embryonnaire est porteuse d'une mutation p.Phe508del mais qu'un allèle est normal (p.Phe508 Normal) est également présent. Cet embryon est hétérozygote pour la mucoviscidose et donc non atteint de la mucoviscidose.



e-figure 15.9

Image d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) interphasique obtenue sur blastomère.

Le père est porteur d'une translocation réciproque 46, XY, t(3; 5)(p14; q12). Les sondes subtélomériques 3p (marquées d'un fluorochrome vert), 3q (en bleu) et 5q (en rouge) permettent de distinguer les cellules équilibrées pour la translocation des cellules déséquilibrées. a. Panel A : l'image indique deux signaux verts, deux signaux bleus et deux signaux rouges correspondant à un blastomère équilibré pour la translocation. b. Panel B : l'image indique trois signaux verts, deux signaux bleus et un seul signal rouge correspondant à un blastomère déséquilibré. L'embryon est porteur d'une trisomie 3p associée à une monosomie 5q.

ENTRAÎNEMENT 15 QCM

QCM 1

Parmi les propositions suivantes concernant le diagnostic prénatal par échographie, laquelle/lesquelles est/sont vraie(s) ?

- A.** La mesure de la clarté nucale est obtenue à l'échographie de 22 SA
- B.** Un syndrome de Turner peut être révélé par une nuque épaisse
- C.** La découverte d'une nuque épaisse justifie la réalisation d'un caryotype foetal
- D.** Une interposition linguale est généralement détectée à l'échographie de 12 SA
- E.** Les trois échographies prénatales recommandées à toute femme enceinte sont réalisées à 12, 22 et 32 SA

QCM 2

Parmi les propositions suivantes concernant les prélèvements réalisés en DPN, laquelle/lesquelles est/sont vraie(s) ?

- A.** L'amniocentèse est réalisée à partir de 12 SA
- B.** L'amniocentèse présente un risque de fausse couche de 0,1 %
- C.** La trophocentèse permet l'établissement d'un caryotype en 24-48 heures
- D.** Une détermination de sexe foetal sur sang maternel peut être réalisée seulement à partir de 11 SA
- E.** Le caryotype obtenu après culture de villosités chorales est établi à partir de cellules plus proches embryologiquement du fœtus que celles utilisées pour celui de l'examen direct

QCM 3

Parmi les propositions suivantes concernant les méthodes de dépistage prénatal, laquelle/lesquelles est/sont vraie(s) ?

- A.** La mesure de la clarté nucale est un élément essentiel au dépistage combiné de la trisomie 21

B. Le dosage de l' α -foetoprotéine est un élément essentiel au dépistage combiné de la trisomie 21

C. Le dépistage combiné est réalisé au premier trimestre de la grossesse

D. Le dépistage séquentiel intégré est réalisé au premier trimestre de la grossesse

E. L'ADN foetal circulant permet le dépistage de la trisomie 21 sur sang maternel

QCM 4

Parmi les propositions suivantes concernant l'identification d'une mosaïque 46,XX/47,XX,+21 obtenue à l'examen direct après trophocentèse, laquelle/lesquelles est/sont vraie(s) ?

- A.** Une contamination par des cellules maternelles doit être suspectée
- B.** Une trisomie 21 en mosaïque vraie doit être suspectée
- C.** Une mosaïque confinée au placenta doit être suspectée
- D.** Une IMG peut être proposée au regard de ces résultats
- E.** Le caryotype permet de distinguer une contamination maternelle d'une trisomie 21 en mosaïque vraie

QCM 5

Parmi les propositions suivantes, quelles sont celles justifiant un diagnostic préimplantatoire en France ?

- A.** Un couple ayant eu un enfant atteint d'une myotonie de Steinert
- B.** Un couple ayant eu un enfant atteint de daltonisme
- C.** Une mère conductrice de myopathie de Duchenne n'ayant pas eu d'enfant atteint
- D.** Un antécédent de trisomie 21 libre et homogène
- E.** Un couple dont les deux membres ont une mutation p.Phe508del à l'état hétérozygote

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 15.3

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant un alignement des valves auriculo-ventriculaires suggérant une cardiopathie à type de canal atrioventriculaire chez un fœtus trisomique 21.



Image : Dr Claudine Le Vaillant.

e-figure 15.4

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant une interposition linguale (flèche du bas) et des os propres du nez courts (flèche du haut), évocateurs de trisomie 21.



Image : Dr Claudine Le Vaillant.

e-figure 15.5

Image échographique 3D réalisée à 22 SA montrant une interposition linguale évocatrice de trisomie 21.



Image : Dr Claudine Le Vaillant.

e-figure 15.6

Image échographique 2D réalisée à 22 SA montrant une clinodactylie du 5^e doigt évocatrice de trisomie 21.



Image : Dr Claudine Le Vaillant.

e-figure 15.7

Image échographique 3D réalisée à 22 SA montrant une oreille bas implantée en rotation postérieure évocatrice de trisomie 21.



Image : Dr Claudine Le Vaillant.

e-figure 15.8

Méthodes directe et indirecte d'un diagnostic moléculaire préimplantatoire pour mucoviscidose chez un couple dont chaque membre est hétérozygote pour une mutation p.Phe508del.

Le diagnostic indirect est basé sur l'analyse de marqueurs génétiques polymorphes (STR). Dans cet exemple, six marqueurs génétiques polymorphes sont utilisés (D7S486, AC17, D7S480, TA17, AC8, I1CA). Le profil indique que cette cellule embryonnaire est porteuse d'une mutation p.Phe508del mais qu'un allèle est normal (p.Phe508 Normal) est également présent. Cet embryon est hétérozygote pour la mucoviscidose et donc non atteint de la mucoviscidose.



e-figure 15.9

Image d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) interphasique obtenue sur blastomère.

Le père est porteur d'une translocation réciproque 46, XY, t(3;5)(p14;q12). Les sondes subtélomériques 3p (marquées d'un fluorochrome vert), 3q (en bleu) et 5q (en rouge) permettent de distinguer les cellules équilibrées pour la translocation des cellules déséquilibrées. a. Panel A : l'image indique deux signaux verts, deux signaux bleus et deux signaux rouges correspondant à un blastomère équilibré pour la translocation. b. Panel B : l'image indique trois signaux verts, deux signaux bleus et un seul signal rouge correspondant à un blastomère déséquilibré. L'embryon est porteur d'une trisomie 3p associée à une monosomie 5q.



Dépistage néonatal : éléments à l'usage des cliniciens généticiens

Bruno Leheup, Michel Roussey

PLAN DU CHAPITRE

Principes généraux d'un dépistage de population	180
Les programmes de dépistage néonatal en France, leur mode d'organisation	180
Les maladies dépistées, leur prise en charge, leur conseil génétique	181
Le dépistage des surdités permanentes néonatales	185
Les évolutions possibles en France	186
Les programmes de dépistage de l'Union européenne et des autres pays	186



L'essentiel à retenir

Le dépistage néonatal en France concerne la phénylcétonurie (PCU), l'hypothyroïdie congénitale (HC), l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), la drépanocytose et la mucoviscidose et la surdité permanente néonatale. Les cinq premières maladies font l'objet d'un dépistage biochimique reposant sur un prélèvement sanguin réalisé de façon optimale vers 72 heures de vie. Il est organisé au niveau national par l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE) et le réseau des associations régionales. La drépanocytose fait l'objet d'un dépistage ciblé en fonction des origines géographiques parentales. Le dépistage de la mucoviscidose repose sur une double stratégie biochimique et génétique qui impose le recueil d'un consentement signé. La confirmation du diagnostic et la prise en charge reposent sur des centres de référence et de compétences propres à chaque pathologie. L'organisation du dépistage de la surdité permanente néonatale relève de la responsabilité des agences régionales de santé (ARS). Si les étiologies des hypothyroïdies congénitales et les surdités sont multiples, les autres pathologies sont récessives autosomiques et la prise en charge du risque génétique familial est nécessaire.

Principes généraux d'un dépistage de population

Le dépistage néonatal (DNN) dans son organisation est conforme aux principes généraux du dépistage en population générale, décrits par Wilson et Jungner dans un document publié par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 1968 [1] :

1. la maladie doit être un problème important de santé;
2. on doit disposer d'un traitement;
3. il faut organiser le diagnostic et le traitement des malades;
4. la maladie doit être reconnue à un stade présymptomatique;
5. la confirmation du dépistage par des méthodes de certitude est obligatoire;
6. le test de dépistage doit être accepté par la population;
7. l'histoire naturelle (évolution) de la maladie doit être comprise;
8. le protocole de traitement doit être défini;
9. le rapport économique coût/bénéfice doit être apprécié;
10. la pérennité du programme doit être assurée.

Le DNN devrait donc concerner une pathologie :

- non prévisible sur la base d'examens spécifiques préalables à la naissance;
- non exceptionnelle (avec une incidence d'au moins 1/10 000 à 1/20 000 naissances);
- dont le diagnostic clinique est impossible ou difficile dans les premiers mois de vie;
- dont la gravité, en l'absence de dépistage et de traitement préventif, conduit à des séquelles irréversibles;
- pour laquelle existe une thérapeutique efficace lorsqu'elle est précocement appliquée et pour laquelle on dispose d'un outil diagnostique qui doit permettre :
 - un prélèvement simple et non agressif chez l'enfant,
 - une expédition facile des échantillons,
 - une technique de dépistage simple, facilement reproductible sur de grandes séries,
 - une rapidité d'obtention du résultat,
 - une méthode peu coûteuse, permettant une rentabilité en termes d'économie de santé.

Le dépistage doit être accepté par la population à laquelle il s'adresse, en matière de contraintes et d'efficacité, avec l'éducation du public pour permettre une adhésion individuelle. Se sont rajoutés la confidentialité des résultats individuels et le consentement parental explicite pour les tests génétiques.

En France, l'organisation du DNN s'est fixé les trois objectifs suivants :

- l'égalité, avec un accès identique de tous les nouveaux-nés aux tests de dépistage et à la prise en charge thérapeutique sur l'ensemble du territoire national, métropole et territoires ultra-marins;
- l'efficacité, avec la recherche d'une sensibilité et d'une spécificité maximales limitant les faux négatifs (enfants malades non dépistés) et les faux positifs (enfants dépistés mais non malades);
- l'utilité, avec le bénéfice direct pour l'individu malade.

Les programmes de dépistage néonatal en France, leur mode d'organisation

Deux types de DNN sont actuellement en place en France.

Le premier groupe repose sur une stratégie biochimique et concerne la phénylcétonurie (PCU), l'hypothyroïdie congénitale (HC), l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), la drépanocytose et la mucoviscidose. Ce dépistage

est réglé par l'arrêté du 22 janvier 2010 [2]. Il n'est pas obligatoire pour les parents mais s'impose aux professionnels de la naissance qui devront enregistrer et notifier le refus parental.

Le second est sensoriel et concerne la surdité permanente néonatale, réglé par l'arrêté du 4 mai 2012 [3].

Le dépistage biochimique est organisé par le réseau national des associations régionales pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (ARDPHE), fédérées au sein de l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE).

Les objectifs de cette organisation sont de permettre :

- une couverture nationale complète;
- un support de prélèvement simple : papier buvard spécial;
- une centralisation régionale ou interrégionale des dosages;
- un réseau de cliniciens spécialistes des pathologies, pédiatres, biologistes, généticiens;
- un recueil des données nationales.

Son organisation est sous la double tutelle du ministère de la Santé et de la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS) qui assure l'intégralité du financement de ce programme de DNN.

Le prélèvement de sang (*a priori* au talon au moyen d'une lancette) est fait à chaque nouveau-né à J3, c'est-à-dire après 72 heures de vie. Une tolérance peut être faite à partir de 48 heures du fait de l'augmentation du nombre des sorties précoces de maternité. En cas de naissance à domicile ou de sortie de maternité avant 48 heures de vie, le prélèvement est sous la responsabilité de la sage-femme libérale. Le sang est recueilli sur un papier buvard spécial adressé le jour même au laboratoire régional afin d'avoir un résultat vers la fin de la 1^{re} semaine de vie, en particulier pour l'HCS qui peut être responsable de décès précoces dès la 2^e semaine de vie, mais aussi pour la PCU et l'HC.

Lorsque la valeur dépasse celle du seuil d'intervention, l'enfant est convoqué par le centre spécialisé régional intégré aux centres de référence ou de compétences maladies rares correspondant à la maladie repérée. Si la démarche diagnostique mise en œuvre confirme la pathologie, l'enfant est pris en charge par le centre spécialisé.

L'enregistrement des dosages effectués est assuré par l'association régionale (AR) en lien avec les laboratoires régionaux agréés. L'association nationale garantit à la CNAMTS que le DNN a bien été réalisé dans les régions et que les enfants atteints repérés sont bien pris en charge. Le mode de financement des AR lié à l'exhaustivité des recueils permet d'obtenir des données épidémiologiques nationales fiables sur les malades dépistés et d'évaluer l'efficacité et l'efficacité de la prévention.

Les maladies dépistées, leur prise en charge, leur conseil génétique

La phénylcétonurie (PCU)

La PCU est une maladie métabolique, récessive autosomique, liée au déficit en phénylalanine hydroxylase (PAH), qui permet la conversion de la phénylalanine en tyrosine. En l'absence de PAH, l'accumulation de phénylalanine dès la période néonatale, est toxique, notamment au niveau cérébral.

Mis en place progressivement dès 1968, mais généralisé en 1972, le DNN de la PCU est justifié par l'incidence de la maladie (1/15 000 naissances), sa sévérité en l'absence de prise en charge thérapeutique (encéphalopathie progressive sévère peu spécifique, microcéphalie, convulsions, hypopigmentation, signes digestifs tardifs au cours des premiers mois, eczéma et odeur caractéristique de « nichée de souris »), l'irréversibilité des signes neurologiques après diagnostic tardif et l'efficacité du traitement (régime pauvre en phénylalanine).

Les formes cliniques et biochimiques

- PCU classique, avec une activité de la PAH très diminuée, inférieure à 1 % de l'activité normale.
- PCU atypique avec un déficit partiel, caractérisé par une activité résiduelle de la PAH (1 à 5 %)
- Hyperphénylalaninémie atypique par déficit en cofacteurs ptéridiniques, qui engendre le plus souvent une hyperphénylalaninémie maligne insensible au régime pauvre en phénylalanine. Sa reconnaissance impose un dosage sérique et urinaire des biopptérides, une mesure de l'activité de la PAH et la réalisation d'un test dynamique par test de charge en protides avec prise orale de biopptérides.
- Hyperphénylalaninémie néonatale transitoire due en général à un régime hyperprotidique ou à une immaturité hépatique transitoire de la PAH.

Le test de dépistage

L'ancien test bactériologique de Guthrie est actuellement remplacé par un test fluorimétrique, ou la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

La confirmation du diagnostic au centre spécialisé régional se fait par un dosage plasmatique de phénylalanine et de tyrosine sur la chromatographie des acides aminés sanguins, sous régime normoprotidique.

Des faux négatifs peuvent être observés chez des enfants en régime hypoprotidique (pathologie chirurgicale digestive, prématuré en nutrition parentérale).

La prise en charge thérapeutique

La PCU classique bénéficie d'une prise en charge efficace par régime restrictif pauvre en phénylalanine adapté à chaque cas et poursuivi à vie, mais allégé à l'adolescence et à l'âge adulte. Ce régime doit être repris de façon stricte chez les femmes PCU avant toute grossesse et tout au long de celle-ci, en raison du risque tératogène lié au passage transplacentaire de la phénylalanine (déficience intellectuelle, microcéphalie, pathologie malformative polyviscérale et RCIU).

Les hyperphénylalaninémies atypiques sont prises en charge par une thérapeutique spécifique.

Le conseil génétique

La PCU est une pathologie autosomique récessive. L'enfant et ses parents doivent être adressés en consultation de génétique. Les mutations dans le gène PAH doivent être recherchées chez l'enfant malade, puis chez ses parents qui sont hétérozygotes. Le risque de récurrence lors des futures grossesses du couple parental est égal à 25 % quel que soit le sexe de l'enfant à naître. Le diagnostic prénatal (DPN) est possible par analyse de génétique moléculaire après biopsie de trophoblaste, dès lors que les mutations ont été identifiées chez le malade.

L'information de la parentèle doit être envisagée en fonction de l'éventuel bénéfice familial (possibilité de DPN moléculaire). Parmi les frères et sœurs sains, la fréquence des hétérozygotes est de 2/3 ; elle est de 1/2 pour les oncles et tantes. Compte tenu de la fréquence des hétérozygotes dans la population générale (1/60 en France), il peut être justifié, pour un couple avec un sujet atteint ou hétérozygote, d'évaluer le risque d'hétérozygotie du conjoint par technique moléculaire.

L'hypothyroïdie congénitale (HC)

L'hypothyroïdie congénitale est une affection cliniquement et génétiquement hétérogène.

Mis en place depuis 1978, le DNN de l'HC est justifié par l'incidence de la maladie (1/3 500 naissances environ), sa sévérité en l'absence de prise en charge thérapeutique (irréversibilité des signes neurologiques et du retard statural après diagnostic tardif, fréquence des signes non spécifiques : hypotonie, ictère persistant) et l'efficacité du traitement hormonal substitutif.

Les formes cliniques

- Hypothyroïdie malformative dysgénétique (athyréose, ectopie cervicale) : représentant 75 à 80 % des formes et plus fréquentes chez la fille (sex-ratio 1:2).
- Troubles de l'hormonogenèse (glande en place), dont les causes sont multiples (anomalies du récepteur à la TSH, des protéines G, du transport d'iode ou de la synthèse de la thyroglobuline).
- Hypothyroïdie dite centrale par anomalie hypophysaire, rare (1 %).

Le test de dépistage

Il doit être réalisé à J3 pour éviter l'interférence avec le pic adaptatif néonatal de TSH (risque de faux positif en cas de test précoce, réalisé avant 48 heures).

Basé sur le dosage de la TSH, il ne dépiste pas les rares hypothyroïdies centrales ni les très rares anomalies du transporteur de la T3 (syndrome d'Allan-Herndon-Dudley, récessif lié à l'X, responsable d'une déficience intellectuelle sévère et sans recours thérapeutique actuel), d'où l'importance du dosage orienté dans les situations prédisposant à une insuffisance thyroïdienne hypothalamo-hypophysaire : malformation de la ligne médiane (fente labio-palatine), trisomie 21, etc.

La confirmation diagnostique est réalisée par le dosage de TSH, T4 et T3 libre, et l'imagerie thyroïdienne.

La prise en charge thérapeutique

La HC est prise en charge dès le diagnostic par substitution hormonale orale par hormone thyroïdienne (lévothyroxine), à vie.

Le traitement précoce est associé à un développement psychomoteur normal. Il faut cependant rechercher les rares formes syndromiques pouvant être associées à un retard psychomoteur indépendant de l'hypothyroïdie.

Le conseil génétique

Les dysgénésies sont le plus souvent sporadiques, même s'il existe de rares formes monogéniques. Si la malformation thyroïdienne s'intègre dans une pathologie polymalformative, il faut s'attacher à rechercher une cause génétique (désordre génomique, hérédité complexe, etc.) et demander l'avis du généticien.

Les troubles de l'hormonogenèse sont le plus souvent autosomiques récessifs et justifient le recours au généticien.

L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) par déficit en 21-hydroxylase

L'hyperplasie congénitale des surrénales par déficit en 21-hydroxylase (HCS-21OH) est une affection autosomique récessive, cliniquement hétérogène, dont les formes à début anténatal ou néonatal peuvent mettre en jeu le pronostic vital.

Mis en place en 1995, le dépistage de l'HCS-21OH ne concerne que les blocs complets en 21-hydroxylase responsables des formes néonatales ou à début anténatal. Il est justifié par leur incidence (1/15 000 naissances environ en France), leur sévérité en l'absence de prise en charge thérapeutique. Il s'agit surtout du risque d'insuffisance surrénale aiguë avec mort inattendue après la première semaine de vie par perte de sel (plus fréquente chez le garçon chez lequel l'attention n'est pas attirée par des anomalies génitales, mais possible aussi chez la fille) et du risque de séquelles cérébrales des accidents de déshydratation. Chez la fille, les anomalies génitales fréquentes (virilisation des organes génitaux externes au cours de la vie intra-utérine) permettent, le plus souvent, d'évoquer le diagnostic dès la naissance voire en anténatal, avant les résultats du DNN.

Les formes cliniques des blocs complets en 21-hydroxylases

- Forme classique avec perte de sel.
- Forme virilisante pure avec perte de sel infraclinique.

Le test de dépistage

Le DNN de l'HCS-21OH est basé sur le dosage de la 17 OH-progesterone à J3. Le seuil est variable suivant l'âge gestationnel à la naissance. Des faux positifs sont fréquents chez les prématurés ou si le prélèvement est réalisé trop tôt (avant 48 heures).

La sensibilité et la spécificité de la stratégie de dépistage sont extrêmement médiocres chez les enfants prématurés en particulier de moins de 32 semaines. Les seuils de dépistage sont adaptés en fonction de l'âge gestationnel chez les nouveau-nés prématurés. La commission technique de l'AFDPHE a proposé que le DNN de l'HCS-21OH ne soit plus effectué chez les prématurés de moins de 32 semaines, qui sont sous la surveillance des néonatalogistes. Un arrêté est en cours de rédaction dans ce sens afin de lever le caractère systématique de ce DNN, qui serait ainsi « battu en brèche » [4].

Prise en charge thérapeutique

Dès le diagnostic, une substitution hormonale surrénalienne doit être mise en place, associant un glucocorticoïde (Hydrocortisone®) et un minéralocorticoïde (Fludrocortisone®).

La prise en charge chirurgicale des anomalies de virilisation chez les filles n'est pas modifiée par le dépistage.

Conseil génétique

Compte tenu du mode de transmission autosomique récessif de l'HCS-21OH, le recours au généticien est nécessaire.

Les mutations dans le gène *CYP21A2* doivent être recherchées chez l'enfant malade, puis chez ses parents qui sont hétérozygotes. Le risque de récurrence lors des futures grossesses du couple parental est égal à 25 % quel que soit le sexe de l'enfant à naître. Le DPN est possible par analyse de génétique moléculaire après biopsie de trophoblaste, dès lors que les mutations ont été identifiées chez le malade. Il est réservé au risque d'homozygotie ou d'hétérozygotie composite pour deux allèles « sévères » (formes néonatales ou à début anténatal).

La prévention du risque de virilisation chez les fœtus féminins est possible par le biais d'un traitement par la dexaméthasone administré à la mère dès 6 semaines d'aménorrhée, après diagnostic de sexe fœtal sur sang maternel. Ce traitement est interrompu après DPN moléculaire si l'enfant attendue n'est pas atteinte et poursuivi jusqu'à la naissance si l'enfant est malade. La sécurité au long terme de cette thérapeutique fœtale fait actuellement l'objet d'un débat, en raison des risques maternels (hypertension artérielle, prise de poids, vergetures, etc.) et potentiellement fœtaux (encore mal évalués).

Compte tenu de la fréquence des hétérozygotes dans la population générale (1/40), l'information de la parentèle est obligatoire afin d'identifier les éventuels couples à risque (recherche des sujets hétérozygotes chez les apparentés par analyse moléculaire, suivie du diagnostic du statut d'hétérozygote chez le conjoint par test à l'ACTH et évaluation génétique).

La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie grave, transmise sur un mode autosomique récessif, dont la prévalence, actuellement estimée à 1/4 500, est plus faible que le laissent penser les études plus anciennes (1/2 500). Génétiquement homogène (gène *CFTR*), elle est hétérogène cliniquement (formes pauci-symptomatiques) et au niveau allélique (plus de 2 000 mutations identifiées).

Mis en place depuis 2002, le DNN de la mucoviscidose a été justifié par la fréquence de l'affection, sa sévérité et l'amélioration du pronostic en termes de qualité de vie si le diagnostic clinique est posé de façon relativement précoce (avant 3 mois) et que la prise en charge est coordonnée au niveau d'un centre spécialisé.

Néanmoins, le DNN de la mucoviscidose déroge partiellement aux critères de Wilson et Jungner par l'absence actuelle d'une thérapeutique curative complète. Le bénéfice du patient est lié à la qualité de l'organisation du parcours du soin permis par la stratégie de dépistage

Le test de dépistage

Il est actuellement basé sur une stratégie complexe en plusieurs temps :

1. dosage biochimique à J3 de la trypsine immunoréactive (TIR);
2. si la valeur seuil de TIR est dépassée : évaluation génétique des 30 mutations les plus communes du locus CFTR (étude génomique sur le prélèvement de sang séché sur le carton buvard de dépistage avec consentement préalable signé);
3. si homozygotie, hétérozygotie composite ou hétérozygotie simple pour une mutation : contrôle clinique et examen de diagnostic (test de la sueur) au centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM);
4. en l'absence de mutation identifiée ou de consentement parental, un nouveau dosage de TIR est réalisé vers J21. Si la valeur est supérieure au seuil, la famille est convoquée au CRCM pour réalisation d'un test de la sueur.

Les faux positifs ont représenté, entre 2002 et 2007, 77 % des patients convoqués pour la réalisation du test de la sueur. Il s'agissait surtout d'hétérozygotes simples.

Pour éviter cet écueil, une discussion est actuellement menée pour envisager une stratégie alternative basée sur le dosage de marqueurs biochimiques (TIR couplée à une protéine d'origine pancréatique, la protéine associée à la pancréatite ou PAP) et l'analyse ADN le cas échéant dans un deuxième temps.

Prise en charge

Elle est multidisciplinaire et repose sur les CRCM [5, 6].

Conseil génétique

Compte tenu du mode de transmission autosomique récessif de la mucoviscidose, le recours à l'équipe de génétique est nécessaire. Les mutations du gène *CFTR* doivent être recherchées chez l'enfant malade, puis chez ses parents

qui sont hétérozygotes. Le risque de récurrence lors des futures grossesses du couple parental est égal à 25 % quel que soit le sexe de l'enfant à naître. Le DPN ou le diagnostic prénatal (DPI) sont possibles, pour les formes sévères, par analyse de génétique moléculaire, dès lors que les mutations ont été identifiées chez le malade.

Compte tenu de la fréquence des hétérozygotes dans la population générale (estimée à 1/30), l'information de la parentèle est obligatoire afin d'identifier les éventuels couples à risque (recherche des sujets hétérozygotes chez les apparentés par analyse moléculaire, suivie du diagnostic du statut d'hétérozygote chez le conjoint par analyse génétique).

Le risque résiduel, en général faible, peut être établi en fonction des performances du kit moléculaire et de l'origine du conjoint.

Problèmes éthiques

Le DNN de la mucoviscidose conduit actuellement à une réflexion sur les améliorations qui pourraient y être apportées, en raison de questionnements éthiques liés au repérage de nouveau-nés suspects de mucoviscidose ne répondant pas aux critères de la maladie :

- formes atypiques pour lesquelles le diagnostic, le pronostic et la prise en charge ne sont pas clairement établis [7];
- certains hétérozygotes, l'identification du caractère hétérozygote sain d'un patient mineur (qui n'aura d'éventuelles conséquences pour lui que lorsqu'il sera en âge de procréer) est en contradiction avec les lois de bioéthique qui interdisent la réalisation d'un diagnostic génétique chez le mineur en dehors de conséquences immédiates sur sa prise en charge.

La faible pathogénicité de certaines mutations antérieurement recherchées a conduit à modifier la liste des mutations recherchées dans les kits de dépistage [7]. Ainsi, à compter du 1^{er} janvier 2015, la mutation R117H ne fait plus partie du kit de dépistage.

La drépanocytose

La drépanocytose est une maladie autosomique récessive plus fréquente dans les populations originaires d'Afrique sub-saharienne, des Antilles, du Moyen-Orient, du bassin méditerranéen et d'Inde. Elle est liée une mutation spécifique du gène de la β -globine présente à l'état homozygote chez les malades. L'anomalie est responsable de la déformation (falciformation) des globules rouges à l'origine de crises vaso-occlusives extrêmement douloureuses, susceptibles de se compliquer d'infarctus, notamment spléniques, d'une anémie et d'infections.

Le DNN est mis en place et généralisé depuis 1989 dans les départements d'outre-mer, et ciblé vers les populations à risque élevé en métropole depuis 1995. Il est justifié par l'incidence de la maladie dans les populations concernées (1/470 naissances dans les DOM et 1/800 naissances en population ciblée en métropole), sa gravité en l'absence de dépistage et de traitement préventif (risque d'accidents thrombotiques et septiques) et la prévention efficace des accidents de falciformation et infectieux.

Néanmoins, la drépanocytose déroge aux critères de Wilson et Jungner par l'absence de traitement curatif.

Le test de dépistage

Il se fonde sur la démonstration électrophorétique d'une hémoglobine anormale (HbS). Le ciblage concerne les populations à risque augmenté :

- soit les deux parents sont originaires de :
 - DOM : Antilles, Guyane, Réunion, Mayotte,
 - Afrique noire, Cap-Vert,
 - Amérique du Sud (Brésil),
 - Inde et pays de l'océan Indien : Madagascar, Ile Maurice, Comores,
 - Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc; Italie du Sud, Sicile, Grèce, Turquie, Moyen-Orient : Liban, Yémen, Arabie saoudite, Oman;
- soit l'un des parents est originaire d'un des territoires/pays précédents et l'autre d'un pays d'Asie;
- soit la mère est à risque mais le père n'est pas connu (celui-ci est peut-être à risque), soit l'un des parents a connaissance de l'existence d'une anomalie de l'hémoglobine chez lui ou dans sa famille.

Traitement préventif

Il vise à éviter les facteurs déclenchant les complications (changements brutaux de température, bains en eau froide, fièvre, activité physique trop intense, stress, déshydratation, séjour en altitude à l'origine d'une raréfaction de l'oxygène) et à prévenir les infections (antibiothérapie quotidienne et vaccinations). Les crises vaso-occlusives sont prises en charge par antalgiques et oxygénothérapie. Ce traitement est coordonné par des centres spécialisés.

Conseil génétique

Compte tenu du mode de transmission autosomique récessif de la drépanocytose, le recours à l'équipe de génétique est nécessaire. La mutation du gène spécifique de la β -globine doit être recherchée à l'état homozygote chez l'enfant malade, puis chez ses parents qui sont hétérozygotes. Le risque de

réurrence lors des futures grossesses du couple parental est égal à 25 % quel que soit le sexe de l'enfant à naître. Le DPN et le DPI sont possibles par analyse de génétique moléculaire. Ils doivent être discutés en fonction des possibilités de prise en charge de la maladie. Compte tenu de la fréquence des hétérozygotes dans certaines populations, l'information de la parentèle peut se révéler nécessaire afin d'identifier les éventuels couples à risque (recherche des sujets hétérozygotes chez les apparentés par analyse moléculaire, suivie du diagnostic du statut d'hétérozygote chez le conjoint par électrophorèse de l'hémoglobine ou analyse génétique).

Problèmes éthiques

Le DNN de la drépanocytose est le seul dépistage biochimique ciblé sur une population, ce qui déroge au principe d'égalité sur lequel est basé le DNN en France. La Haute Autorité de santé (HAS) a récemment émis un avis favorable à cette dérogation, dans cette indication précise, sur la base de la perte d'efficacité de la stratégie de dépistage si elle était étendue à l'ensemble de la population [8]. L'argumentaire économique est discuté par les éthiciens et l'acceptation « politique » d'une stratégie fait partie des critères de Wilson et Jungner; une évolution de ce ciblage est possible.

Le dépistage des surdités permanentes néonatales

Le dépistage généralisé des surdités permanentes néonatales à l'ensemble de la population est mis en place depuis 2013. Il est justifié par l'incidence de ce handicap sensoriel d'étiologie très hétérogène (1/1 000 naissances), son diagnostic clinique difficile avant la fin de la première année de vie et l'irréversibilité des séquelles verbales en l'absence de dépistage et de prise en charge rééducative précoce.

Organisation du dépistage

L'organisation nationale est déléguée par décret aux ARS qui choisissent un opérateur régional. Il peut s'agir d'une ARDPHE ou d'un réseau de périnatalité. Le cahier des charges auquel doivent répondre les opérateurs a été publié en novembre 2014.

Le test

Deux méthodes de dépistage sont utilisées :

- l'évaluation des potentiels évoqués auditifs automatisés (PEAA);
- les otoémissions acoustiques (OEA).

Par ces techniques, 1 à 2 % des nouveau-nés ont une réponse anormale, nécessitant alors une fréquence élevée de « retests » en maternité. Si celui-ci se révèle à nouveau anormal, l'enfant est adressé pour confirmation secondaire dans un centre de référence de diagnostic avant l'âge de 1 mois.

La prise en charge

La stimulation sensorielle précoce est systématique, l'approche par implant cochléaire précoce a également démontré son intérêt de façon associée, mais le choix de l'éducation (langue des signes, stimulation, etc.) appartient aux parents après information claire et objective.

Conseil génétique

Les surdités sont très hétérogènes au plan étiologique. Pour les formes génétiques, tous les modes de transmission peuvent être observés : autosomique récessif ou dominant et lié à l'X. Les surdités peuvent s'intégrer dans une affection polymalformative. L'avis de l'équipe de génétique est donc nécessaire. En fonction du diagnostic, l'analyse génétique pourra parfois être ciblée vers un gène d'intérêt. En cas de surdité isolée, le nombre de loci impliqués peut justifier le recours à une étude génétique par technique de séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblé sur les gènes de surdité. Le conseil génétique sera fonction du mode de transmission de la pathologie.

Les problèmes éthiques

Certaines associations de malentendants craignent que la stratégie de dépistage systématique soit vécue comme une stigmatisation sociale de la surdité [9]. Les modalités d'organisation régionale du dépistage permettent aux associations de patients de s'intégrer au réseau local de prise en charge.

Les évolutions possibles en France

La mise en place de la technique de spectrométrie de masse en tandem, utilisée dans de nombreux autres pays, devrait permettre le dépistage de nombreuses maladies métaboliques au premier rang desquels le déficit en MCAD (Acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne) [10–12, 14]. Pour être efficace, cette stratégie de dépistage

doit se faire sur des ensembles plus grands que la plupart des régions administratives actuelles.

Ceci conduirait à réduire le nombre des centres de dépistage néonatal en France. La complexité des pathologies dépistées doit aussi s'associer à une modification des modalités d'information des parents sur le dépistage néonatal, qui devrait être réalisée pendant le 3^e trimestre de la grossesse.

D'autres maladies métaboliques posent aussi de multiples problèmes médicaux économiques et éthiques [13]. La prédiction de la sévérité réelle chez le patient dépisté est un problème pour d'autres maladies dont le spectre de sévérité n'est pas immédiatement prévisible sur des données métaboliques ou génétiques. On peut citer, à titre d'exemple, les maladies de Hurler et de Scheie (MPS I), deux tableaux cliniques très différents dus au déficit de la même enzyme, la L-iduronidase. Les approches thérapeutiques sont très différentes et fonction de l'expression. L'enzymothérapie substitutive est réservée aux formes modérées, sans atteinte neurologique, car elle ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et ne peut donc pas traiter les atteintes neurologiques qui relèvent de la greffe de cellules-souches hématopoïétiques. L'absence de corrélation génotype-phénotype satisfaisante rend le choix thérapeutique complexe après dépistage.

Les programmes de dépistage de l'Union européenne et des autres pays

Compte tenu de la complexité de cette question nous renvoyons le lecteur à la présentation disponible en ligne [14].

Références

- [1] Roussey M. Les principes et l'organisation du dépistage néonatal en France. Arch Pediatr 2008; 15 : 734–7.
- [2] Journal officiel de la République française n° 0025 du 30 janvier 2010, page 1870. Texte n° 27. Arrêté du 22 janvier 2010 fixant la liste des maladies donnant lieu à un dépistage néonatal : www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2010/1/22/SASP1002048A/jo/texte.
- [3] Journal officiel de la République française n°0105 du 4 mai 2012, page 7915. Texte n° 48. Arrêté du 23 avril 2012 relatif à l'organisation du dépistage de la surdité permanente néonatale : www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2012/4/23/ETSP1210025A/jo/texte.
- [4] Huet F, Godefroy A, Cheillan D, et al. Faut-il maintenir un dépistage de l'hyperplasie congénitale des surrénales pour les prématurés ? Arch Pediatr 2014; 21 : 233–6.

- [5] Munck A, Roussey M. Dépistage néonatal de la mucoviscidose : les enjeux de la prise en charge. *Arch Pediatr* 2012; 19 : S30–2.
- [6] Sermet-Gaudelus I, Couderc L, Vrielynck S, et al. Recommandations nationales pour la prise en charge du nourrisson dépisté atteint de mucoviscidose. Consensus de la fédération des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose. *Arch Pediatr* 2014; 21 : 654–62.
- [7] Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, et al. CFTR p.Arg117H is associated with CBAVD and other CFTR-related disorders. *J Med Genet* 2013; 50 : 220–7.
- [8] Haute Autorité de santé. Dépistage néonatal de la drépanocytose en France : pertinence d'une généralisation du dépistage à l'ensemble des nouveau-nés. Décembre 2013. www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1724724/fr/depistage-neonatal-de-la-drepanocytose-en-france-pertinence-dune-generalisation-du-depistage-a-lensemble-des-nouveau-nes.
- [9] Comité consultatif national d'éthique. Avis n° 103. Éthique et surdité de l'enfant : éléments de réflexion à propos de l'information sur le dépistage systématique néonatal et la prise en charge des enfants sourds : www.ccne-ethique.fr/fr/publications/ethique-et-surdite-de-lenfant-elements-de-reflexion-propos-de-linformation-sur-le#VJCGcmSG8zc.
- [10] Sarles J, Huet F, Cheillan D, et al. Dépistage néonatal en France : quel avenir ? *Arch Pediatr* 2014; 21 : 813–5.
- [11] Roussey M. Une ère nouvelle pour le dépistage néonatal en France ? *Arch Pediatr* 2012; 19 : 109–10.
- [12] Haute Autorité de santé. Recommandations pour l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD. Juin 2011. www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-07/fs_depistage_neonatal-fr-v3.pdf.
- [13] Feillet F, Chabrol B, Sarles J, et al. Le dépistage néonatal face au défi des progrès de la biologie. *Arch Pediatr* 2014; 21 : 816–20.
- [14] Cornel MC. Extending neonatal screening programmes building on screening criteria. In : ESPKU conference Liverpool; 20th October 2012. www.emgo.nl/files/934.
- [15] Informations générales, www.afdphe.org.

ENTRAÎNEMENT 16 QCM

QCM 1

Concernant les prélèvements nécessaires pour les dépistages biochimiques :

- A. Il peut être fait durant le 2^e jour de vie
- B. Il peut être fait dans le 3^e jour de vie
- C. Les prélèvements sont collectés sur un buvard
- D. Les prélèvements sont envoyés à un centre régional
- E. Une information spécifique est donnée au préalable du prélèvement

QCM 2

Concernant les prélèvements nécessaires pour les dépistages biochimiques :

- A. Un consentement signé est nécessaire pour l'évaluation du risque de drépanocytose
- B. Un consentement signé est nécessaire pour l'évaluation du risque de la mucoviscidose
- C. Un consentement signé est nécessaire pour l'évaluation du risque de l'hyperplasie surrénale congénitale
- D. Un enfant dont les deux parents sont nés aux Antilles doit bénéficier du dépistage ciblé de la drépanocytose
- E. Un enfant dont la mère est née au Maghreb et dont le père n'est pas connu doit bénéficier du dépistage ciblé de la drépanocytose

QCM 3

Concernant les maladies dépistées par le dépistage biochimique :

- A. Le taux de faux positif pour l'hyperplasie surrénale congénitale est important chez les enfants prématurés
- B. Le dépistage de l'hypothyroïdie en France ne permet pas le dépistage des hypothyroïdies d'origine hypophysaire
- C. Un dosage des hormones thyroïdiennes est nécessaire chez les enfants présentant une malformation médiane de la face

D. Les hyperphénylalaninémies sont toutes liées à un déficit de la phénylalanine hydroxylase

E. Une malformation génitale est souvent associée aux formes sévères d'hyperplasie surrénale congénitale chez les nouveaux nés 46,XX

QCM 4

Concernant le conseil génétique après dépistage :

- A. Le dépistage de la drépanocytose permet de mettre en évidence la plupart des sujets hétérozygotes au locus β -globine
- B. Le dépistage de la mucoviscidose permet de mettre en évidence la plupart des sujets hétérozygotes au locus CFTR
- C. Un sujet porteur d'une forme classique d'hyperplasie surrénale est homozygote ou hétérozygote composite pour des allèles sévères
- D. Le frère normal d'un sujet porteur d'une mucoviscidose à 2/3 de risque d'être hétérozygote si ses parents sont de phénotype habituel
- E. Un sujet porteur d'une surdité dépistée en période néonatale a le plus souvent un parent sourd

QCM 5

Concernant le dépistage de la surdité :

- A. Il est fondé sur l'utilisation des otoémissions acoustiques ou des PEA
- B. La valeur prédictive négative du test est bonne
- C. Tous les types de surdité sont détectables en période néonatale
- D. L'objectif principal est de permettre la prise en charge précoce d'une surdité sévère permettant la mise en place d'une communication verbale si possible
- E. Le nombre des faux positifs est important

This page intentionally left blank

Le diagnostic présymptomatique dans les maladies neurodégénératives héréditaires à début tardif

Cyril Goizet, Gaëtan Lesca

PLAN DU CHAPITRE

Diagnostic présymptomatique et médecine prédictive	190
Règles éthiques et recommandations	190
Structure et objectifs de la démarche	191
Expérience dans la MH	192
Extension aux autres maladies neurodégénératives héréditaires	193
Conclusion	194



Prérequis

Connaissance des modes de transmission des maladies humaines.



L'essentiel à retenir

1. Le DPS correspond à une activité médicale encadrée légalement.
2. Il doit être effectué par une équipe pluridisciplinaire déclarée à l'Agence de la biomédecine.
3. Le respect d'un délai minimum entre le début de la démarche et les prélèvements est un élément capital.
4. Le DPS ne doit pas être effectué, en principe, chez un mineur en l'absence de mesures préventives ou curatives immédiates.

Diagnostic présymptomatique et médecine prédictive

Les nombreuses découvertes de la génétique moléculaire ont été essentielles dans les progrès accomplis pour le diagnostic de nombreuses maladies héréditaires. Elles ont permis de proposer un conseil génétique fiable aux malades ainsi qu'à leurs apparentés. Elles ont également abouti à la possibilité de recourir à un diagnostic prénatal (DPN) dans les affections de pronostic sévère et irrémédiable. Pour les maladies à début tardif, le diagnostic présymptomatique (DPS) représente un nouveau champ d'application pour la génétique médicale, chez les sujets à risque élevé pour une maladie monogénique donnée. Le DPS s'applique aux situations dans lesquelles la révélation d'un résultat défavorable est synonyme de l'apparition inéluctable d'une maladie au cours de la vie, en dehors des situations où la pénétrance est incomplète [1]. Il représente donc une situation extrême dans le domaine de médecine prédictive qui, elle, s'applique aux maladies multifactorielles. La médecine prédictive a pour objet de déterminer à l'avance quelles maladies se développeront chez une personne donnée, mais porte essentiellement sur la mise en évidence de facteurs de risque relatifs, qui ne sont ni nécessaires, ni suffisants au développement d'une affection donnée. À l'heure actuelle, les applications de médecine prédictive demeurent extrêmement limitées en pratique clinique, à l'opposé du DPS dont le volume d'activité ne cesse d'augmenter au fil des découvertes de nouveaux gènes responsables de maladies de

début tardif. Les personnes concernées par le DPS sont donc asymptomatiques ou, éventuellement, n'ont pas conscience des signes déjà présents de l'affection. Cette approche pose toutefois d'épineux problèmes médicaux, éthiques et humains. L'existence d'un bénéfice médical, d'un traitement préventif ou curatif, permet de résoudre en partie ces problèmes. C'est le cas dans certaines formes familiales de cancer, comme la polypose adénomateuse familiale, ou les syndromes de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire, ou encore dans le syndrome du QT-long congénital. Par contre, l'absence de tout traitement préventif ou curatif accentue les problèmes éthiques et humains. Les maladies neurodégénératives héréditaires de révélation tardive illustrent parfaitement ce dernier cas de figure, la maladie de Huntington (MH) constituant même un modèle d'approche du diagnostic présymptomatique. En effet, le DPS a été proposé dans la MH dès 1985, initialement par diagnostic indirect (analyses de liaison génétique) puis par détection directe de la mutation causale à partir de 1993 [2].

Règles éthiques et recommandations

Les conditions de réalisation des DPS dans la MH ont fait l'objet de recommandations internationales dès 1990 dans le but de limiter l'impact potentiellement néfaste sur un plan psychologique et social des résultats du test moléculaire sur les candidats asymptomatiques [3]. Formulées par la Fédération mondiale de neurologie (World Federation of Neurology) et l'Association internationale Huntington (The International Huntington Association), ces recommandations s'appuyaient sur plusieurs principes éthiques fondamentaux (voir encadré ci-dessous). Adaptées en 1994, essentiellement en raison de la possibilité nouvelle d'un diagnostic direct [4], elles soulignent la nécessité d'un protocole de prise en charge pluridisciplinaire respectant un intervalle de temps minimum entre la première consultation d'information et la prise de décision définitive et visant à préparer le candidat à recevoir son résultat. La demande doit être formulée de façon autonome, sans pression extérieure, par un adulte à risque élevé de développer une maladie identifiée chez un apparenté. Le candidat est libre d'interrompre sa démarche à tout moment. Le résultat est rendu directement à l'intéressé à l'occasion d'une consultation. Un suivi est systématiquement proposé après l'annonce du résultat.

Principes éthiques à l'origine de la démarche d'encadrement du DPS

- **Communication** : le candidat doit bénéficier d'une information relative à la maladie, son mode de transmission et le déroulement du test.
- **Autonomie** : le candidat doit prendre une décision qui reflète son choix personnel et résulte d'une bonne information et d'un temps de réflexion suffisant.
- **Liberté** : la décision du candidat ne doit pas être soumise à l'influence d'un tiers. La liberté de ne pas savoir doit être préservée.
- **Non-maléfice** : l'issue du test ne doit pas être néfaste pour le candidat.
- **Bénéfice** : le candidat doit tirer un bénéfice du test.
- **Égalité, justice** : chaque citoyen doit pouvoir bénéficier du test s'il le souhaite, sans contrainte financière.
- **Confidentialité** : au cours de l'ensemble de la procédure, l'équipe ne communique qu'avec le candidat et les accompagnants qu'il a choisis.

L'activité de DPS s'inscrit en France dans le cadre du décret 2000-570 du 23 juin 2000 (modifié le 6 août 2004) fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne. Les obligations légales reflètent largement ces recommandations internationales. Les équipes pluridisciplinaires désirant pratiquer des DPS doivent notamment réunir des compé-

tences cliniques et génétiques et être déclarées à l'Agence de la biomédecine. En règle générale, et d'après la loi, le DPS ne peut pas être proposé aux mineurs en raison de l'absence de bénéfice thérapeutique ou préventif, dans le but de préserver leur autonomie vis-à-vis d'une décision future.

Structure et objectifs de la démarche

La démarche actuelle du DPS dans la MH, conforme aux dispositions légales, reprend les différentes étapes du protocole de conseil génétique décrit dans les recommandations internationales avant sa diffusion en pratique clinique [4]. Les candidats au DPS intègrent, à leur demande, une démarche de prise en charge comportant plusieurs consultations avec les membres de l'équipe pluridisciplinaire, composée d'un généticien, d'un conseiller en génétique, d'un neurologue ou d'un autre spécialiste d'organe en fonction de la pathologie (oncologue, cardiologue, etc.), d'un psychiatre, d'un psychologue et d'une assistante sociale. Les candidats sont en principe asymptomatiques mais il arrive parfois qu'ils aient déjà débuté la maladie sans en avoir conscience. Les consultations s'étendent sur une durée de trois mois environ, respectant quatre étapes successives (figure 17.1), dont le but est de permettre une prise de décision mature et de limiter les conséquences

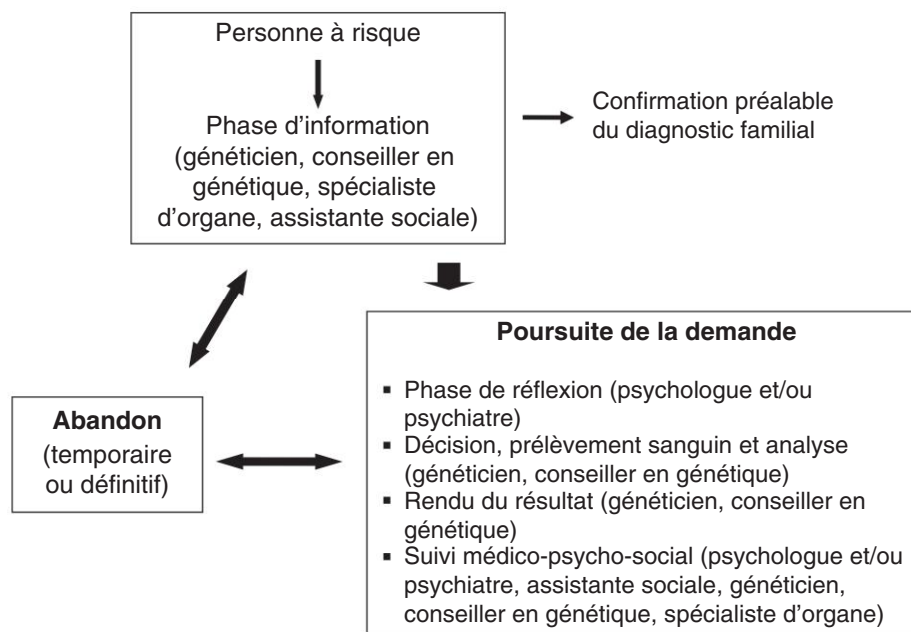


Figure 17.1

Démarche générale et étapes du test présymptomatique.

éventuellement néfastes du test. La majorité des équipes françaises impliquées dans le domaine sont réunies au sein du Groupe français de neurogénétique présymptomatique afin d'échanger leur expérience et d'optimiser la prise en charge des candidats.

La première consultation fournit au candidat une information détaillée des caractéristiques cliniques et génétiques de la maladie, des modalités de la démarche, ainsi que des limites de l'analyse moléculaire, et permet le recueil des renseignements personnels et familiaux. Par la suite, le candidat rencontre les autres intervenants, ce qui l'amène progressivement à préciser ses motivations et appréhender les conséquences d'un bon ou d'un mauvais résultat sur sa vie personnelle, familiale et sociale. Les membres de l'équipe essaient d'aider le candidat pour qu'il soit capable de prendre une décision qu'il ne regrettera pas, sans pour autant porter de jugement sur le bien-fondé de ses motivations. Parallèlement, il est indispensable d'obtenir la confirmation moléculaire de la maladie chez un apparenté symptomatique si cela n'a pas été fait auparavant, de façon à ne pas livrer un résultat faussement rassurant, car ne correspondant pas à la maladie présente dans la famille. Les candidats sont incités à venir accompagnés par un proche (parent ou ami) qui pourra leur apporter un soutien tout au long de la démarche. À l'issue de ces consultations, deux prélèvements sanguins sont réalisés, à des moments différents (afin d'éviter tout risque d'erreur), après recueil d'un consentement écrit. Bien qu'il soit rarement proposé au candidat de différer la décision de faire le test, cela est parfois nécessaire si l'équipe estime qu'il n'est pas en mesure d'affronter un résultat (pour cause de dépression et d'anxiété majeure en général). Le résultat est rendu oralement par le généticien au cours d'un rendez-vous fixé à l'avance. Le candidat est libre d'abandonner ou de suspendre la démarche à tout moment, y compris le jour du résultat. Des consultations de suivi sont proposées à tous les candidats quel que soit leur résultat; la première au cours de la semaine qui suit, puis d'autres à moyen et à long terme et à la demande de la personne et de son entourage.

Expérience dans la MH

Attitudes des sujets à risque

Alors que les enquêtes réalisées auprès des associations de familles avant que le DPS ne soit techniquement faisable laissaient présager une forte demande émanant des personnes à risque vis-à-vis de la MH (jusqu'à 80 % des individus

interrogés affirmaient qu'ils feraient un DPS si celui-ci était disponible), il s'avère que la participation à cette démarche (jusqu'au résultat) est faible et correspond environ à 5–20 % de la population à risque [5–7]. En France, entre 1993 et 2000, environ 9 % de la population à risque pour la MH est venue consulter dans un centre pluridisciplinaire [8], le nombre de demandes restant stable d'une année à l'autre. Parmi ces candidats au DPS, seuls 55 % ont effectivement été au bout de la démarche jusqu'à l'obtention du résultat moléculaire, ce qui représente 5 % de l'ensemble de la population à risque de 50 %. Le fait que près de la moitié (45 %) des demandeurs décide de ne pas poursuivre la démarche confirme l'importance de laisser un délai de réflexion suffisant aux candidats et d'adopter une attitude non directive de la part des membres de l'équipe pluridisciplinaire, permettant une prise de décision que les candidats n'auraient pas à regretter ultérieurement. La grande majorité des abandons survient à l'issue de la consultation initiale d'information tandis que le nombre d'abandon est faible par la suite.

Caractéristiques des candidats

Les études menées dans la MH depuis le milieu des années 1980 ont permis d'obtenir de nombreux renseignements sur les candidats au DPS. Les caractéristiques des candidats sont globalement comparables d'une étude à l'autre. Les principales données concernant les candidats français sont présentées ici.

Risque *a priori* des candidats

L'immense majorité des candidats (95 %) possède un risque *a priori* de 50 % d'avoir hérité l'allèle muté d'un des parents qui est atteint (père ou mère). Les autres ont un risque de 25 %, ce qui signifie que l'un de leurs grands-parents est malade et que le parent potentiellement transmetteur ne connaît pas son statut génétique. Cette situation peut générer des conflits d'intérêts – toutefois rarement observés en pratique – dans la mesure où le DPS peut dévoiler le statut du parent alors qu'il ne le souhaite pas.

Données sociodémographiques

Les caractéristiques sociodémographiques des candidats au DPS sont habituellement comparables à celles de la population générale hormis une récurrente sur représentation des femmes (sex-ratio homme/femme entre 1/1,5 et 1/2 suivant les études) et des catégories socioprofessionnelles

élevées [7, 8]. La surreprésentation féminine s'expliquerait par une plus grande implication des femmes dans la vie familiale ou dans un projet parental ainsi qu'une volonté accrue de faire face aux décisions difficiles et à leurs conséquences [7]. En France, l'âge moyen des candidats lors de la première consultation se situe autour de 34 ans. La majorité des candidats vivent en couple et la moitié a déjà des enfants.

Motivations des candidats

La motivation la plus fréquemment avancée par les candidats est celle de la levée d'une incertitude devenue pour eux insupportable. La deuxième motivation la plus fréquente est représentée par un projet parental, ce qui était attendu en raison de l'âge moyen des candidats, autour de la trentaine : certains souhaitent, s'ils sont porteurs de l'allèle muté, demander un diagnostic prénatal (DPN) ou un diagnostic préimplantatoire (DPI) afin de ne pas donner naissance à un enfant qui sera plus tard atteint ; d'autres, plus rares, renonceront à avoir des enfants s'ils sont porteurs. Les autres motivations communément citées concernent l'information de la descendance, les projets professionnels ou financiers, ou la préparation de l'avenir. Il faut préciser qu'il est possible, pour des couples dont le sujet à risque ne souhaite pas effectuer le DPS, de demander un DPI d'exclusion, c'est-à-dire que tous les embryons implantés sont porteurs de l'haplotype du grand-parent sain. Par contre, le DPN d'exclusion n'est, quant à lui, pas pratiqué en France pour des raisons éthiques, puisqu'il aboutirait à l'interruption d'une grossesse normale dans la moitié des cas. Il est néanmoins pratiqué dans d'autres pays.

Résultats et conséquences du DPS

Plusieurs études dans la MH ont révélé un plus grand nombre de sujets non porteurs de la mutation parmi les candidats testés par rapport à la proportion théoriquement attendue de 50–50 [6, 8]. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons :

- les personnes qui ont débuté la maladie ne sont plus des candidats potentiels pour un DPS ;
- certains sujets ont dépassé l'âge moyen de début de la maladie entraînant une diminution de leur risque théorique ;
- certaines études incluaient des personnes à risque de 25 %.

Il est intéressant de relever que les membres de l'équipe pluridisciplinaire avaient noté au cours de la démarche des

signes discrets chez certains candidats laissant suspecter un début de la MH [8]. Ces candidats n'avaient évidemment pas conscience de ces signes. Parmi ceux qui ont finalement été testés, un tiers a reçu un résultat favorable signifiant donc que les doutes de l'équipe vis-à-vis d'une atteinte frustrée n'étaient pas toujours fondés. Ceci met tout particulièrement l'accent sur la prudence à adopter dans la prise en charge de tels candidats et sur la nécessité de se baser sur la nature de leur demande qu'il faut intégrer dans une démarche classique de DPS.

Les candidats testés répondent favorablement au suivi qui leur est proposé quel que soit le résultat (3/4 des sujets sont suivis en France). Ceci a permis de constater que le résultat a peu de répercussions à court terme sur l'attitude reproductive des couples concernés. En effet, un nombre équivalent de grossesses est observé chez les candidats testés, qu'ils soient porteurs ou non de la mutation. Seulement la moitié des grossesses à risque a fait l'objet d'un DPN. La fréquence des effets indésirables (idées suicidaires, tentative de suicide, suicide, hospitalisation en psychiatrie, détresse psychologique, dépression, séparation conjugale, sentiment de culpabilité) avoisine les 15 % des candidats suivis [8, 9], ce qui concourt à justifier la nécessité de la prise en charge intensive proposée lors de la réalisation d'un DPS. Il convient, tout de même, de préciser la rareté des réactions catastrophiques (suicides, tentatives de suicide, hospitalisations en psychiatrie) qui ne représentent que 1–2 % des cas [8, 10]. Ces réactions catastrophiques ont été constatées aussi bien après un résultat défavorable que favorable, ce qui illustre les difficultés d'adaptation d'un individu à la connaissance de son statut génétique. Ce processus d'adaptation est difficile et nécessite aussi du temps.

Extension aux autres maladies neurodégénératives héréditaires

Maladies de sévérité comparable à la MH

Plusieurs maladies neurodégénératives héréditaires de révélation tardive et de gravité comparable à la MH peuvent aujourd'hui être diagnostiquées sur un plan moléculaire, élargissant le champ d'application du DPS. C'est le cas des ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes ou SCA (*spinocerebellar ataxia*), des maladies à prion familiales, des formes familiales de maladie d'Alzheimer, de démence frontotemporale ou de sclérose latérale amyotrophique, des

démences vasculaires (CADASIL, angiopathies amyloïdes), maladie d'Alexander, etc. La prise en charge des candidats au DPS de telles maladies s'inscrit logiquement dans une démarche identique à celle mise en place pour la MH. L'expérience française dans les SCA révèle des similitudes avec la MH en ce qui concerne les caractéristiques et les attitudes des candidats, ainsi que les conséquences du test [8].

Maladies moins sévères que la MH ou avec bénéfice médical

D'autres maladies neurodégénératives héréditaires considérées comme moins sévères, comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la myopathie facio-scapulo-humérale et les paraplégies spastiques héréditaires, ou pouvant bénéficier d'une surveillance médicale avec prise en charge symptomatique de certaines complications en particulier cardiaque comme dans la maladie de Steinert ou dans les laminopathies A/C, peuvent également faire l'objet d'une demande de DPS. La prise en charge est alors adaptée aux caractéristiques de l'affection considérée (âge de début, sévérité, existence de mesures préventives ou thérapeutiques efficaces, possibilité d'orientation professionnelle, pénétrance des mutations), mais elle doit toujours respecter un délai minimum de réflexion entre la consultation d'information et les deux prélèvements sanguins pour l'analyse génétique. Le protocole de consultations est allégé par rapport à ce qui est proposé dans les affections sévères, avec une phase de préparation beaucoup plus courte mais un entretien psychologique est hautement recommandé.

Particularités du DPS chez les mineurs

La problématique du DPS dans le cas des maladies neurodégénératives ne s'applique, dans le cas des mineurs, pas seulement aux maladies autosomiques dominantes mais également à des maladies autosomiques récessives (ex. : ataxie de Friedreich) ou à des maladies liées à l'X (ex. : adrénoleucodystrophie), pouvant débiter à un âge variable. Les questions d'ordre éthique ou psychologique que soulève le DPS chez les sujets majeurs sont bien évidemment renforcées dans le cas des mineurs. Le cadre légal (décret 2000-570 du 23 juin 2000, modifié le 6 août 2004) stipule que les examens à visées génétiques ne peuvent être prescrits chez le mineur que s'il peut bénéficier de mesures préventives ou curatives immédiates, ce qui est rarement le cas dans les affections neurodégénératives pour lesquels il n'existe souvent pas de traitement curatif. De plus, la demande de

DPS chez le mineur est souvent motivée ou influencée par les parents ou la famille, ce qui peut entraver son autonomie. Le rôle de l'équipe pluridisciplinaire est d'écouter la demande de l'enfant/adolescent et celle des parents puis d'envisager avec eux les différents enjeux du DPS. En principe, si le DPS pour les maladies neurodégénératives n'est pas recevable chez les enfants très jeunes, il peut être envisagé chez les adolescents à condition que ceux-ci soient impliqués personnellement dans la démarche. L'attitude des équipes médicales est également modulée dans les (rares) cas pour lesquels il existe un bénéfice médical pour l'enfant de connaître son statut génétique, comme la surveillance cardiaque qui est recommandée à partir de 10–12 ans pour la maladie de Steinert ou les laminopathies A/C, ou bien, pour les adultes, dans les cas (également rares en pratique) où une orientation professionnelle est en jeu.

La préparation et le temps de réflexion revêtent, dans le cas des mineurs, un caractère essentiel et il est important de veiller à ce que le test ne soit pas un moyen de résoudre un conflit familial ni des préoccupations concernant le bien-être personnel des parents ou leur décision d'avoir d'autres enfants. Les parents, en conduisant leur enfant à demander un DPN, cherchent souvent à être rassurés (c'est-à-dire qu'ils attendent un bon résultat) ce qui ne survient que dans 50 à 75 % des cas, selon le mode de transmission de la maladie considérée.

Conclusion

Le bénéfice lié à l'encadrement du DPS dans la MH par une prise en charge pluridisciplinaire respectant les principes éthiques et le temps de réflexion des candidats est aujourd'hui bien établi. En France, l'activité de DPS est encadrée légalement et nécessite la déclaration obligatoire de l'équipe à l'Agence de la biomédecine. La loi de bioéthique traduit la reconnaissance, par le conseil d'État, du caractère spécifique des tests présymptomatiques par rapport aux tests diagnostiques et la nécessité d'une équipe pluridisciplinaire pour répondre de façon appropriée à la demande de DPS et en limiter les éventuelles conséquences néfastes.

La dernière modification de la loi de bioéthique, par l'arrêté du 27 mai 2013, stipule qu'une information particulière doit être donnée sur le caractère familial des maladies génétiques et des risques pour la famille si le patient garde le silence sur ses propres résultats. Il renforce ainsi la responsabilité conjointe du patient et du médecin prescripteur (pas forcément du généticien) du test génétique vis-à-vis des apparentés potentiellement à risque. En ce qui concerne les maladies neurodégénératives héréditaires à début tardif,

on pourrait logiquement s'attendre à une augmentation du nombre de demandes de DPS.

Dans tous les cas, il est important de garder à l'esprit les deux points suivants :

- la perception d'une affection génétique par les familles peut être différente de celle que nous pouvons en avoir en tant que membres des équipes médicales;
- le fait d'apprendre son statut génétique n'est jamais sans conséquences pour les candidats et a invariablement des répercussions sur le plan personnel et familial, sans corrélation avec la sévérité relative de l'affection considérée.

Références

- [1] Harper PS. What do we mean by genetic testing? *J Med Genet* 1997; 34 : 749–52.
- [2] Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72 : 971–83.
- [3] International Huntington Association and World Federation of Neurology. Ethical issues, policy statement on Huntington disease molecular genetics, and predictive tests. *J Med Genet* 1990; 27 : 34–8.
- [4] International Huntington Association and World Federation of Neurology. Guidelines for the molecular genetics predictive tests in Huntington disease. *Neurology* 1994; 44 : 1533–6.
- [5] Tibben A, Frets PG, van de Kamp JJP, et al. Presymptomatic DNA-testing for Huntington disease : pretest attitudes and expectations of applicants and their partners in the Dutch program. *Am J Med Genet* 1993; 48 : 10–6.
- [6] Laccone F, Engel U, Holinski-Feder E, et al. DNA analysis of Huntington's disease : five years of experience in Germany, Austrian, and Switzerland. *Neurology* 1999; 53 : 801–6.
- [7] Harper PS, Lim C, Craufurd D. Ten Years of presymptomatic testing for Huntington's disease : the experience of the UK Huntington's Disease Prediction Consortium. *J Med Genet* 2000; 37 : 567–71.
- [8] Goizet C, Lesca G, Dürr A on behalf of the French Group for presymptomatic testing in neurogenetic disorders. Presymptomatic testing in Huntington's disease and autosomal dominant cerebellar ataxias. *Neurology* 2002; 59 : 1330–7.
- [9] Lawson K, Wiggins S, Green T, et al. Adverse psychological events occurring in the first year after predictive testing for Huntington's disease. *J Med Genet* 1996; 33 : 856–62.
- [10] Almquist EW, Bloch M, Brinkman R, et al. A worldwide assessment of the frequency of suicide, suicide attempts, or psychiatric hospitalization after predictive testing for Huntington disease. *Am J Hum Genet* 1999; 64 : 1293–304.

ENTRAÎNEMENT 17 QCM-QCS

QCM 1

À propos des tests présymptomatiques, quelles sont les propositions vraies ?

- A.** Ils peuvent être effectués lors dès la première consultation
- B.** Ils doivent être effectués par une équipe pluridisciplinaire
- C.** Il s'agit d'une activité encadrée sur le plan légal
- D.** Les praticiens les pratiquant doivent être déclarés à l'Agence de la biomédecine
- E.** Ils sont strictement interdits chez les mineurs dans toutes les situations

QCM 2

À propos du test présymptomatique pour la maladie de Huntington, quelles sont les propositions vraies ?

- A.** Il ne peut être demandé que par des personnes à risque de 50 % d'avoir reçu la mutation
- B.** Il est un prérequis indispensable pour demander un diagnostic prénatal
- C.** Il est un prérequis indispensable pour effectuer un diagnostic préimplantatoire
- D.** Il peut être demandé par des personnes à risque de 25 % d'avoir reçu la mutation
- E.** La pénétrance de la mutation est de 50 %

QCM 3

À propos du test présymptomatique, quelles sont les propositions vraies ?

- A.** Il s'agit d'une démarche individuelle
- B.** Il s'agit d'une démarche qui implique les apparentés
- C.** Le respect d'un délai de réflexion est un élément capital
- D.** Son encadrement est gouverné par des principes d'éthique médicale
- E.** Il est préférable que le diagnostic ait été confirmé, sur le plan moléculaire, dans la famille

QCS1

À propos des tests présymptomatiques, quelles sont les propositions vraies ?

- A.** Ils représentent une situation particulière de médecine prédictive
- B.** Test présymptomatique et test prédictif sont des termes strictement interchangeables
- C.** Ils concernent des maladies à pénétrance complète
- D.** Ils ne concernent que des maladies pour lesquelles il n'y a aucun traitement curatif
- E.** Il ne concerne que les affections neurodégénératives héréditaires

This page intentionally left blank

Dispositions législatives entourant la pratique des tests génétiques

Perrine Malzac

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	198
Principes généraux pour la pratique des tests génétiques	199
Encadrements spécifiques	201
Conclusion	202



Points essentiels

Principes généraux pour la pratique des tests génétiques :

- Primauté de l'individu sur la société.
- Partage de l'information au sein de la famille.
- Droit à l'information.
- Recueil du consentement par écrit.
- Protection des personnes incapables de consentir.
- Droit de ne pas savoir.
- Utilité clinique et qualité des tests.
- Droit à un suivi médical individualisé et au conseil génétique.
- Respect de la confidentialité et de la vie privée.
- Égalité d'accès aux soins.

Introduction

Ce chapitre a pour but d'évoquer l'encadrement juridique pour la pratique des tests génétiques en médecine, dont les principales dispositions apparaissent dans la loi du 7 juillet 2011 (loi relative à la bioéthique).

L'usage des tests génétiques pour l'identification d'une personne par ses empreintes génétiques dans le cadre de procédures judiciaires ne fera pas l'objet de ce chapitre.

À propos des droits de la personne

Depuis la première version du 29 juillet 1994 (loi relative au respect du corps humain et loi relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal), puis à nouveau lors des deux révisions successives du 6 août 2004 et du 7 juillet 2011 (loi relative à la bioéthique), le terme retenu par le législateur pour désigner les tests génétiques est « examens des caractéristiques génétiques de la personne ».

Peut-être peut-on entendre derrière ce parti pris lexical l'inquiétude qui a présidé à la promulgation de la loi : l'idée qu'en explorant les caractéristiques des gènes d'un individu, on puisse accéder directement aux caractéristiques de la personne, à son intimité biologique ? Ainsi, pour le législateur français, l'usage des tests génétiques nécessite une particulière vigilance du fait des risques d'atteintes aux droits fondamentaux de la personne : risques de discrimination et risques d'atteinte à l'intimité, à l'intégrité physique et psychique, à l'identité, à la dignité et à la liberté.

La même préoccupation est à l'origine des règles européennes en la matière, le protocole additionnel à la Convention d'Oviedo sur les Droits de l'homme et la bio-médecine relatif aux tests génétiques à des fins médicales (du 27 novembre 2008).

À titre d'illustration, les deux articles suivants du *Code civil* (CC), inscrits dans la partie concernant le droit des personnes, déterminent précisément le cadre dans lequel les tests génétiques peuvent (ou ne peuvent pas) être pratiqués en France :

- art. L.16-10 al.1 : « L'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ne peut être entrepris qu'à des fins médicales ou de recherche scientifique. » ;
- art. L.16-13 : « Nul ne peut faire l'objet de discriminations en raison de ses caractéristiques génétiques. »

À propos de la génétique

Le recours aux tests génétiques en pratique médicale est à plusieurs « dimensions » :

- *une dimension diagnostique* lorsque l'exploration des gènes (voire du génome) d'une personne malade permet de déterminer l'origine de ses troubles ;
- *une dimension familiale*, car les gènes se transmettent de génération en génération ; ainsi, les membres d'une même famille partagent une partie de leur patrimoine génétique. De ce fait, l'étude des gènes d'un individu peut avoir des conséquences pour ses apparentés, conséquences qui devront être prises en compte dans la démarche de conseil génétique ;
- *une dimension prédictive*, lorsque l'on retrouve des anomalies génétiques qui permettent de connaître à l'avance, pour un sujet en bonne santé, ses risques de développer une maladie : on parle de diagnostic présymptomatique ;
- *une dimension liée à la reproduction*, si le test génétique est réalisé au cours d'un diagnostic prénatal et concerne un fœtus *in utero* ou au cours d'un diagnostic préimplantatoire et concerne un embryon conçu *in vitro* ;
- *une dimension d'aide à la prescription thérapeutique*, dans le cadre de la pharmacogénomique. L'usage de certains médicaments nécessite l'étude de variants génétiques pour adapter leur prescription (leur efficacité ou leurs effets secondaires pouvant dépendre de ces caractéristiques) ;
- *une dimension de recherche scientifique*, afin de faire progresser les connaissances sur les maladies génétiques et leur traitement. Les tests génétiques sont alors réalisés dans le cadre de protocoles de recherche.

Pour ce qui concerne la recherche en génétique, en plus du cadre juridique issu de la loi de bioéthique, il est nécessaire de se référer au protocole qui régit la recherche

biomédicale (*loi du 20 décembre 1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales*, complétée par la *loi du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique*). Nous ne l'aborderons pas dans ce chapitre.

Principes généraux pour la pratique des tests génétiques

Remarque : l'arrêté du 27 mai 2013 définit les règles de bonnes pratiques applicables à l'examen des caractéristiques d'une personne à des fins médicales. L'arrêté du 8 décembre 2014 définit les règles de bonnes pratiques relatives à la mise en œuvre de l'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques à finalité médicale. Ces règles de bonnes pratiques émanent d'une proposition conjointe de l'Agence de la biomédecine et de la Haute Autorité de santé, comme prévu par la loi.

Primauté de l'individu sur la société

Le patient doit rester au centre des préoccupations tout au long de la démarche en génétique médicale.

Les tests génétiques sont réalisés dans l'intérêt direct et premier de la personne à laquelle ils sont prescrits. Toutefois, ce principe pourra être modulé en cas d'intérêts parallèles pour des tiers (des membres de la famille) ou pour la collectivité (au travers de la démarche de recherche).

Partage de l'information au sein de la famille

Lorsque les données génétiques d'une personne peuvent être utiles à ses apparentés, la loi prévoit tout un dispositif pour favoriser la transmission des informations au sein de la famille.

Il peut aussi arriver que des tests génétiques soient prescrits à une personne malade à l'occasion d'une demande de conseil génétique émanant de membres de sa famille. Dans ce cas de figure, les proches expriment leur inquiétude, souvent lors d'un projet de grossesse, s'ils craignent d'être vecteur de l'affection familiale non encore étiquetée. Ils demandent à la personne malade de leur entourage d'accepter les tests génétiques par solidarité, pour les aider à connaître leur risque et à agir en conséquence.

Droit à l'information

C'est un des droits des usagers du système de santé, inscrit dans la loi du 4 mars 2002, et sur lequel la loi de bioéthique et les textes réglementaires affiliés insistent particulièrement.

Avant la réalisation du test, une information détaillée doit être délivrée à la personne lors d'une consultation individuelle, en face-à-face avec un médecin spécialisé connaissant la maladie et ses aspects génétiques. Cette information devra être « loyale, claire, appropriée » et adaptée au niveau de compréhension afin de permettre une décision éclairée.

Elle sera complétée, en expliquant le caractère héréditaire des maladies génétiques et le devoir de transmettre, le cas échéant, l'information aux apparentés.

À l'issue des analyses, sauf volonté exprimée d'être tenue dans l'ignorance du diagnostic, le patient est informé des résultats obtenus. Seul le médecin prescripteur est habilité à rendre ces résultats lors d'une consultation individuelle. Les éléments d'informations communiqués doivent être résumés dans un document écrit.

Recueil du consentement par écrit

« Le consentement exprès de la personne doit être recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle a été dûment informée de sa nature et de sa finalité. »

Art. L.16-10, al. 2 du CC

Il est révoquant à tout moment.

Le prescripteur doit produire une attestation de consultation précisant qu'il a informé le patient et recueilli son consentement. Aucune investigation en génétique ne peut être réalisée en l'absence de ce document.

« Toutefois, lorsqu'il est impossible de recueillir le consentement de cette personne ou, le cas échéant, de consulter la personne de confiance, la famille ou, à défaut, un de ses proches, l'examen ou l'identification peuvent être entrepris à des fins médicales, dans l'intérêt de la personne. »

Art. L.1131-1, al. 2 du *Code de la santé publique* (CSP)

Protection des personnes incapables de consentir

Ces personnes sont davantage protégées du fait de leur plus grande vulnérabilité. Le consentement de leurs représentants légaux est nécessaire, à savoir pour les mineurs,

les titulaires de l'autorité parentale, et pour les majeurs sous tutelle, le tuteur. Dans tous les cas, leur assentiment est également recherché, dans la mesure du possible, en fonction de leur degré de maturité et/ou de leur capacité de discernement.

Il est précisé que « les examens peuvent être prescrits chez un mineur ou chez un majeur sous tutelle si celui-ci ou sa famille peuvent personnellement bénéficier de mesures préventives ou curatives immédiates » (art R.1131-5 al. 3 du CSP).

Droit de ne pas savoir

Qui dit consentement, dit aussi possibilité de refuser de consentir. Ainsi, chacun doit rester libre, s'il le souhaite, et après avoir été dûment informé des conséquences de son refus, de ne pas réaliser un test génétique. Le droit de ne pas savoir se décline aussi à travers le fait qu'une fois le test réalisé, chacun peut exprimer sa volonté d'être tenu dans l'ignorance du diagnostic posé. Cependant, ce principe devra être modulé en cas de risque de transmission aux apparentés. Dans ce cas, le médecin peut être autorisé, par la personne malade, à procéder à l'information des membres de sa famille potentiellement concernés.

Utilité clinique et qualité des tests

L'utilité clinique devrait être un critère majeur de prescription, utilité pour le sujet ou pour sa famille. L'arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques précise : « le seul fait qu'un examen soit disponible et réalisable ne justifie ni de sa prescription, ni de sa réalisation. »

Quant aux tests eux-mêmes, leur validité (aussi bien lors de la réalisation que lors de la restitution des résultats) est évaluée par des contrôles de qualité. En France, les laboratoires sont soumis à autorisation via les agences régionales de santé (ARS) et, hors du cadre spécifique du diagnostic prénatal, c'est l'Agence de la biomédecine (ABM) qui est chargée de délivrer un agrément aux biologistes qui pratiquent les tests génétiques (art. L.1131-3 du CSP).

Droit à un suivi médical individualisé et au conseil génétique

La réalisation de tout test doit être suivie, chaque fois que nécessaire, d'une prise en charge personnalisée et d'une démarche de conseil génétique. L'arrêté du 27 mai 2013 définissant les règles de bonnes pratiques précise :

« Si nécessaire, la personne doit être orientée vers une consultation de conseil génétique complémentaire ou vers un praticien spécialiste de la maladie considérée, en particulier lorsque la prise en charge médicale spécifique est nécessaire. »

Plus loin, il est précisé :

« Le recours à un accompagnement psychologique doit être envisagé dans tous les cas. »

Respect de la confidentialité et de la vie privée

Une des menaces les plus graves pour la personne serait que les résultats de l'examen de ses caractéristiques génétiques puissent être utilisés par la société, à ses dépens. En effet, les assurances, les entreprises, les banques pourraient trouver avantages à connaître ces informations génétiques individuelles pour orienter leurs décisions. Les sujets atteints de maladies génétiques ou à risque de l'être devraient-ils subir en plus de l'injustice de la maladie, la discrimination et le rejet social ?

Une vigilance toute particulière en matière de secret professionnel et de souci de confidentialité entoure la pratique des tests génétiques (rappelons, par exemple, les mesures suivantes : remise des résultats en main propre au cours d'une consultation individuelle par le médecin prescripteur, interdiction de pratiquer des tests génétiques à d'autres fins que médicales ou de recherche).

L'égalité d'accès aux soins

Le principe d'égal accès aux soins est un principe récurrent dans la loi française, non spécifique de la génétique, et que l'on retrouve en particulier dans la loi « Hôpital, patients, santé et territoires » (HPST) du 21 juillet 2009. L'objectif est de faciliter l'accès à des soins de qualité pour tous les citoyens, malgré les obstacles, en particulier géographiques et financiers.

Cette question se pose de façon particulièrement aiguë en génétique humaine, tant pour l'accès à une démarche diagnostique que pour l'inclusion dans des protocoles de recherche ou la prescription des nouvelles thérapeutiques. La constitution de filières de santé « maladies rares » prévue par le second Plan national maladies rares (PNMR 2011–2014) devrait permettre d'améliorer l'accès aux soins pour les patients atteints de maladies génétiques et leurs familles.

Encadrements spécifiques

En raison de la dimension familiale

L'information familiale : devoir moral ou obligation légale envers les apparentés ?

Lorsque le diagnostic d'une maladie génétique est posé pour la première fois dans une famille, le choc de l'annonce est double : tout d'abord pour la personne atteinte, ensuite pour les membres de sa famille avec lesquels elle partage une partie de ses gènes.

Les connaissances sur la maladie du « cas index » ont souvent un intérêt pour sa parentèle. Certaines maladies génétiques, si elles sont dépistées suffisamment tôt, peuvent bénéficier de soins spécifiques ou de mesures de prévention. Plus souvent encore, c'est la possibilité d'obtenir des informations qui est considérée comme un avantage (droit de savoir, organisation de sa vie procréative, etc.).

Lors de la révision de la loi de bioéthique en juillet 2011 (art. L.1131-1-2 du CSP), le législateur propose les mesures suivantes : préalablement à la réalisation de tests génétiques, l'information délivrée en consultation doit aborder cette dimension familiale et l'éventuel devoir d'informer la parentèle. La situation qui impose de se préoccuper d'informer la parentèle est ainsi décrite :

« Si une anomalie génétique grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention, y compris de conseil génétique, ou de soins était diagnostiquée. »

Ainsi, la possibilité de recourir à un conseil génétique est considérée comme une mesure de prévention.

Ce devoir d'information de la parentèle échoit en priorité au consultant. Le médecin doit aider la personne à transmettre l'information aux membres de sa famille, en désignant les personnes à risque et en remettant un résumé écrit des données à transmettre.

Si la personne ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille, elle peut demander par écrit au médecin prescripteur de procéder à cette information.

« Le médecin porte alors à leur connaissance l'existence d'une information médicale à caractère familial susceptible de les concerner et les invite à se rendre à une consultation de génétique, sans dévoiler ni le nom de la personne ayant fait l'objet de l'examen, ni l'anomalie génétique, ni les risques qui lui sont associés. »

Cette procédure peut être considérée comme une nouvelle dérogation à la règle du secret professionnel.

La loi en étend même la portée aux situations de don de gamètes ou d'embryon ayant abouti à la conception d'un ou de plusieurs enfants. Si le patient est à l'origine d'un tel don, il peut autoriser le médecin prescripteur à saisir le responsable du centre d'assistance médicale à la procréation afin qu'il procède à l'information des enfants issus du don.

En raison de la dimension prédictive

Le diagnostic présymptomatique : pour un encadrement des pratiques

La médecine prédictive désigne toute démarche qui cherche à déterminer, parfois longtemps à l'avance, quelles maladies frapperont un sujet. Cette tentation de prédire l'avenir, pour tenter de le modifier, semble faire partie des plus anciens rêves de l'humanité.

En médecine, l'avènement de la génétique a donné une nouvelle forme à ces pratiques, les rendant plus scientifiques et parfois efficaces. Contrairement à la démarche curative, où le médecin est sollicité par un sujet souffrant qui requiert des soins, les situations de dépistage et de prédiction s'adressent à des personnes *a priori* saines, qui ne formulent pas de plainte et qui, parfois, ne demandent rien. Alors qu'elles se sentaient « en bonne santé », elles pourront se découvrir « malades » ou « futures malades ».

Aujourd'hui, les possibilités prédictives ne concernent véritablement qu'un petit nombre de maladies dont le déterminisme génétique est fort et peu influencé par l'environnement (l'exemple le plus souvent cité est celui de la maladie de Huntington, affection neurologique grave qui débute à l'âge adulte). Avec l'acquisition de nouvelles connaissances et de nouvelles techniques d'exploration du génome humain, les perspectives d'extension de la médecine prédictive à des affections plus communes et plus nombreuses (telles que les maladies cardiovasculaires ou les cancers) par la recherche de facteurs de susceptibilité génétique, sont sur le point d'advenir. Le but serait de mieux protéger des sujets reconnus comme vulnérables en leur proposant une prise en charge adaptée.

L'expérience des équipes pluridisciplinaires de diagnostic présymptomatique, rassemblant des compétences cliniques et génétiques, s'est avérée très utile pour la mise en œuvre de cette médecine de prédiction.

Il est indispensable de délivrer une information précise (sur le but, les limites et les perspectives de l'analyse) et de laisser un temps de réflexion suffisant entre la demande de test génétique et sa réalisation. Ce temps ne va pas être seulement un temps d'attente : il est surtout un temps d'élaboration de la

volonté de la personne, aidée par l'équipe pluridisciplinaire, en particulier par le psychologue, selon un protocole type.

Le droit de savoir ne doit pas pour autant faire oublier le droit de ne pas savoir, liberté de rester dans l'ignorance de son statut génétique et de son risque. Selon les mesures de prévention disponibles, leur efficacité et leur disponibilité, les praticiens auront pour mission d'alerter les consultants sur des conséquences possibles de leur choix de savoir ou de ne pas savoir.

Enfin, on comprend que dans ces situations particulières, un absolu respect de la confidentialité soit attendu des praticiens, tout au long de la démarche.

En médecine fœtale et reproductive

Les centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN)

Dans le cadre du diagnostic prénatal, des tests génétiques peuvent être pratiqués à partir de tissus fœtaux prélevés *in utero* (liquide amniotique ou villosités choriales le plus souvent) ou, désormais, à partir d'ADN circulant dans le sang maternel. Lorsque les résultats indiquent la présence d'une affection génétique grave et incurable, la médecine, confrontée à ses limites thérapeutiques, peut être amenée à proposer une interruption de la grossesse et à la réaliser si le couple parental en fait la demande (comme autorisé par la loi Veil depuis le 17 janvier 1975).

Au cours du diagnostic préimplantatoire, l'analyse est réalisée à partir d'une ou deux cellules prélevées sur des embryons conçus *in vitro* après quelques heures de développement. À l'issue d'un tri, seuls les embryons n'ayant pas reçu le génotype caractéristique de l'affection génétique recherchée seront conservés pour l'implantation dans l'utérus maternel.

Encadrement juridique du diagnostic prénatal (L.2131-1 à 3 et L.2213.1 à 3 du CSP)

Une consultation médicale est nécessaire avant la réalisation de toute analyse biologique dans le cadre du diagnostic prénatal. En cas de risque avéré, l'information est donnée par un praticien d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal et porte « sur les objectifs, les modalités, les risques, les limites et le caractère non obligatoire des examens proposés », ainsi que « sur les caractéristiques de l'affection suspectée, les moyens de la détecter et les possibilités de prévention, de soin ou de prise en charge adaptée du fœtus ou de l'enfant né ». Au terme de cette information, la femme enceinte doit

consentir par écrit à la réalisation des analyses proposées. Toute décision d'interruption médicale de grossesse (IMG) fait l'objet d'une discussion collégiale au sein d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN). La femme enceinte ou le couple peut participer à la décision en rencontrant des membres de l'équipe du CPDPN préalablement à la concertation et en étant représenté par un médecin de son choix lors de la concertation.

« Hors urgence médicale, la femme se voit proposer un délai de réflexion d'au moins une semaine avant de décider d'interrompre ou de poursuivre sa grossesse. »

Une IMG ne peut être pratiquée qu'avec le consentement de la femme enceinte.

L'encadrement juridique du diagnostic préimplantatoire (L.2131-4 du CSP)

Un médecin exerçant son activité dans un CPDPN

« doit attester que le couple, du fait de sa situation familiale, a une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic »

« Le diagnostic ne peut être effectué que lorsqu'a été préalablement et précisément identifiée, chez l'un des parents ou l'un de ses ascendants immédiats..., l'anomalie ou les anomalies responsables d'une telle maladie. »

Le consentement des deux membres du couple doit être recueilli, par écrit.

La recherche de caractéristiques biologiques supplémentaires pouvant bénéficier à un enfant malade de la fratrie (par exemple : recherche de la compatibilité HLA en vue d'une greffe de sang de cordon en cas de thalassémie majeure) est autorisée, dans le cadre d'une démarche de diagnostic préimplantatoire, au cas par cas, sous conditions et sous couvert de la délivrance d'une autorisation par l'Agence de la biomédecine.

Conclusion

En France, la pratique des tests génétiques est très encadrée par la loi (loi relative à la bioéthique) et par plusieurs décrets qui déclinent les bonnes pratiques professionnelles en la matière. Il est important de connaître ce cadre normatif afin d'agir dans le meilleur intérêt des patients et de leur famille. Il est cependant possible que ces dispositifs soient amenés à évoluer aux regards des possibilités d'exploration étendue des génomes individuels offerts par les technologies les plus récentes.

ENTRAÎNEMENT 18 QROC

QROC 1

Citez les principes à respecter lors de la prescription et la réalisation de tests génétiques (examens des caractéristiques génétiques de la personne).

QROC 2

Caractéristiques de l'information préalable au recueil du consentement.

QROC 3

Caractéristiques de l'information lors du rendu de résultat.

QROC 4

Dans quelles circonstances faut-il mettre en œuvre la démarche d'information familiale en génétique ?

QROC 5

Lorsqu'une affection génétique est diagnostiquée, qui doit informer la parentèle ?

QROC 6

Conditions de prescription des tests génétiques pour les mineurs et les majeurs sous tutelle.

Pour compléter sa réflexion

Texte intégral de la loi de bioéthique : www.legifrance.gouv.fr

Bilans d'activité en génétique : www.agence-biomedecine.fr

Protocole additionnel à la Convention sur les Droits de l'homme et la biomédecine relatif aux tests génétiques à des fins médicales. Conseil de l'Europe : www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/default_FR.asp

This page intentionally left blank

Enjeux éthiques, juridiques et psychologiques en génétique médicale

Perrine Malzac

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	206
À propos de la génétique appliquée au diagnostic prénatal et préimplantatoire	206
À propos des approches d'exploration globale du génome	208
Conclusion	210

Introduction

Il est souvent reproché à l'éthique et à sa déclinaison juridique de produire, par leurs excès de prudence, des freins à la connaissance et aux progrès scientifiques. Bien au contraire, la démarche éthique, dans ce qu'elle est radicalement réflexive, a pour vertu essentielle de nous permettre d'agir, mais d'agir en conscience de la complexité des enjeux, d'agir au regard de l'impérative nécessité du respect des personnes.

Face aux fulgurants progrès de la génétique, une question s'impose : que veut-on faire socialement des savoirs et des pouvoirs que la science nous donne ?

Nous distinguerons, de façon sans doute quelque peu artificielle et réductrice, deux déclinaisons du rapport entre savoir et pouvoir :

- lorsque nous avons plus de savoir que de pouvoir : à propos de la génétique appliquée au diagnostic prénatal et préimplantatoire ;
- lorsque nous avons plus de pouvoir que de savoir : à propos des approches d'exploration globale du génome.

À propos de la génétique appliquée au diagnostic prénatal et préimplantatoire

Définition

Le diagnostic prénatal (DPN) est un acte médical individuel qui concerne une femme enceinte et s'intéresse à l'état de santé de l'enfant qu'elle porte, afin de prévenir certaines des conséquences de l'affection diagnostiquée. Cependant, pour ce qui concerne les affections génétiques, elles sont souvent graves et incurables. Le médecin se trouve alors confronté à ses limites thérapeutiques et peut accepter de pratiquer une interruption de la grossesse si le couple parental informé en fait la demande.

En effet, en France, depuis la loi du 17 janvier 1975 (loi Veil), l'interruption de grossesse pour motif médical (IMG) est possible à tout moment de la grossesse en particulier lorsqu'« existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité, reconnue comme incurable au moment du diagnostic ».

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) consiste à réaliser un diagnostic biologique à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro*. Il offre la possibilité de distinguer, parmi un lot d'embryons, ceux qui pourront être transférés dans

l'utérus maternel, poursuivre leur développement et donner naissance à un enfant. Ainsi, dans le DPI, après la phase du diagnostic vient inéluctablement une deuxième phase, celle de la sélection.

Ce sont le possible recours à l'IMG ainsi qu'à la démarche de tri embryonnaire qui appelle à une réflexion éthique de la part de l'ensemble des acteurs, les praticiens, les couples concernés et, au-delà, la société tout entière.

La question de l'eugénisme

Le terme d'eugénisme a été inventé en 1883 par Francis Galton, cousin de Charles Darwin. Étymologiquement, on retrouve les termes grecs : *eu* qui signifie « bon » et *genos* qui signifie « naissance ». Ce mot désigne l'ensemble des méthodes (biologiques, génétiques, etc.) et pratiques (médicales, sociales, morales, etc.) dont l'objectif est d'améliorer le patrimoine génétique de l'espèce humaine.

L'Allemagne nazie, dès 1933, a développé une politique eugéniste et raciste avec pour objectifs de favoriser la procréation d'individus dits supérieurs et d'empêcher la reproduction d'humains considérés comme indésirables (handicapés, homosexuels, alcooliques, etc.) ou racialement impurs (Juifs, Tziganes, etc.). Cette époque dramatique de l'histoire a démontré combien une telle théorie pouvait aboutir à des actes portant atteinte à la dignité de la personne humaine.

En France, la loi est formelle ; elle interdit et punit sévèrement toute pratique eugénique :

« Toute pratique eugénique tendant à l'organisation de la sélection des personnes est interdite. »

Art. L.16-4 du *Code civil* (CC)

« Le fait de mettre en œuvre une pratique eugénique tendant à l'organisation de la sélection des personnes est puni de trente ans de réclusion criminelle et de 7 500 000 € d'amende. »

Art. L.214-1 du *Code pénal* (CP)

De nos jours cependant, la notion d'eugénisme est réinterrogée. La réflexion vaut d'être menée pour déterminer si une nouvelle forme d'eugénisme pourrait résulter, non plus d'une politique d'État, mais de la somme de décisions individuelles convergentes.

La question du potentiel eugénique des pratiques de DPN et de DPI est parfois éludée. Prenons l'exemple de leur énoncé : c'est la dimension diagnostique qui est valorisée, quitte à passer sous silence ce qu'il advient en cas de résul-

tat défavorable, l'interruption de la grossesse ou la sélection embryonnaire, c'est-à-dire la décision d'arrêter la vie débutante du fœtus ou des embryons identifiés comme « gravement malades ».

DPN ou DPI sont socialement acceptés, et encadrés par la loi de bioéthique (loi du 7 juillet 2011) dans la mesure où ils résultent de démarches individuelles, issus d'un choix libre et éclairé. Ce choix est toujours difficile pour le couple confronté à la perspective des souffrances à venir (pour l'enfant, pour l'entourage et pour lui-même).

Les craintes de dérive eugénique portent sur le passage possible d'une démarche individuelle à un choix collectif :

- soit par la somme de démarches individuelles normalisées (par exemple, par la banalisation du recours à l'IMG en cas de diagnostic d'une déficience mentale);
- soit par l'organisation de dépistage en population (par exemple, par l'extension et la systématisation de l'évaluation du risque de trisomie 21 au cours des grossesses).

Pour protéger les pratiques de DPN comme DPI d'une dérive par trop eugénique, plusieurs conditions semblent requises :

- le respect de la loi de bioéthique dont les dispositions imposent le recours à un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal pour toute décision d'IMG ou de DPI. De plus, il semble important que cette loi ne puisse faire l'objet de modifications qu'à la suite de débats citoyens de façon à prendre en compte les enjeux éthiques soulevés;
- le choix délibéré (et sa mise en œuvre assumée, tant sur le plan éducatif que financier) de développer la recherche, les outils thérapeutiques et les structures adaptées pour les personnes souffrant de ces maladies graves et aujourd'hui incurables;
- la volonté de ne pas occulter les questions de fond, questions cruciales pour l'avenir puisqu'elles touchent au respect de la vie et de la dignité ainsi qu'au regard que nous portons sur l'autre dans sa différence et sa singularité.

Les centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN)

L'encadrement juridique français (loi de bioéthique du 7 juillet 2011) impose que toute décision d'IMG et toute indication de recours au DPI fassent l'objet d'une discussion collégiale au sein d'un CPDPN. Les CPDPN ont aussi des

missions d'expertise et de santé publique. Ils peuvent être sollicités pour donner leur avis sur les démarches diagnostiques, thérapeutiques et pronostiques à déployer en cas de suspicion d'une affection fœtale. Ils sont chargés d'organiser des actions de formation et de favoriser l'égal accès de tous aux démarches de DPN et de DPI. Ils dépendent, pour leur fonctionnement, d'une autorisation de l'Agence de la biomédecine après vérification de leur organisation en lien avec des praticiens en gynécologie-obstétrique, échographie obstétricale, génétique médicale et néonatalogie/pédiatrie.

Au cours des démarches de DPN et de DPI, le questionnement éthique va concerner les critères pour statuer sur « la particulière gravité » et « l'incurabilité » d'une affection qui seuls autorisent l'IMG ou le tri embryonnaire. Qui va apprécier au mieux la particulière gravité ? Qui est légitime pour le faire ? Le couple, futurs parents, en fonction des informations reçues et du vécu de la situation ? Les praticiens sur la base des connaissances scientifiques et au regard de leur expérience professionnelle ? Ou peut-être même la société sur des éléments socio-économiques ? Et comment décider lorsque les avis des uns ou des autres divergent ?

Pour être considérée comme « particulièrement grave », une maladie doit-elle être mortelle dans l'enfance, ou bien à l'origine d'un handicap mental ou même d'un handicap physique, esthétique ou fonctionnel ? Que dire d'une maladie rapidement évolutive mais qui ne se déclarerait qu'à l'âge adulte ? Que dire d'une maladie chronique, peu grave, mais nécessitant des soins quotidiens tout au long de la vie ? Comment gérer l'incertitude diagnostique, fréquente en période prénatale ? Et que faire lorsque persiste un doute, quand, arrivé aux limites des connaissances médicales, il faut dire son ignorance, dire que « probablement tout ira bien, mais... » ?

Actuellement, le recours au CPDPN cherche à garantir les conditions suivantes :

- que la décision soit contextualisée, analysée au cas par cas;
- qu'elle prenne en compte la position de la femme enceinte et de son conjoint jusque dans leur perception subjective et traumatisante de la situation, après qu'ils aient été correctement informés;
- qu'elle émane d'une discussion collégiale entre les différents professionnels susceptibles d'y participer;
- que soit mis en place un accompagnement psychologique du couple afin de réhabiliter les deux dimensions d'écoute et de temps indispensables pour faire face au tragique de la situation vécue.

À propos des approches d'exploration globale du génome

Alors même que les conditions techniques pour l'exploration des génomes personnels semblent réunies, permettant d'espérer l'acquisition rapide de connaissances et une meilleure compréhension des déterminants génétiques à l'origine des maladies, se pose la question des conséquences individuelles et collectives de leurs développements.

Les enjeux éthiques sont considérables et obligent chacun, les professionnels et les usagers du système de santé, les politiques, les industriels et chaque citoyen, à s'interroger au sujet des usages de ces nouveaux outils d'exploration mais aussi au sujet des discours véhiculés à leur propos. Nous traiterons des questions plus spécifiquement soulevées par l'application de ces techniques au diagnostic des maladies génétiques, approche actuellement en plein développement.

Du bon usage des techniques d'exploration du génome en situation de diagnostic : limiter l'incertitude et informer au mieux

Limiter l'incertitude

Jusqu'à présent, la plupart des tests génétiques utilisés dans les laboratoires de diagnostic étaient ciblés sur un ou quelques gènes candidats. Les techniques d'exploration étendue du génome, aujourd'hui disponibles, s'en distinguent par leur capacité à étudier simultanément un très grand nombre de gènes ou de régions génétiques. Si l'on n'y prend garde, elles sont à même d'aboutir à la production de résultats inattendus, incertains, ininterprétables ou, pour le moins, non encore interprétables. De plus, si elles permettent de produire, relativement aisément, un très grand nombre de données brutes, elles nécessitent des traitements informatiques et des compétences multiples pour les traduire tout d'abord sous la forme des résultats biologiques puis secondairement d'informations cliniques adaptées, compréhensibles et utiles.

Les praticiens en génétique, conscients des difficultés prévisibles, tentent de s'organiser à travers leurs associations (Association nationale des praticiens de génétique moléculaire [ANPGM], Fédération française de génétique humaine [FFGH]) pour harmoniser leurs pratiques et édicter des guidelines. À ce jour, les grandes lignes d'un guide de bonnes pratiques pour l'usage, en diagnostic, des techniques de

séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été élaborées dans le cadre d'EuroGentest, structure financée par la Commission européenne pour harmoniser le recours aux tests génétiques dans les différents pays d'Europe.

Enfin, pour un bon usage de ces technologies, se pose la question des compétences et de l'expertise que devront posséder non seulement les biologistes en charge du rendu des résultats mais aussi des prescripteurs, en charge de l'information, avant et à l'issue des tests génétiques. Pour un bon usage de ces technologies, se pose aussi la question des échanges et collaborations indispensables à établir entre les cliniciens prescripteurs et les biologistes pour une juste interprétation des données du séquençage dans le meilleur intérêt du patient.

Informer en situation d'incertitude

Des questions éthiques, souvent abordées dans la littérature, comme parmi la communauté des généticiens, concernent les procédures d'information et de recueil du consentement.

Qu'est-ce que donner une information claire, loyale, appropriée et compréhensible en condition d'incertitude : incertitude sur la valeur clinique et la signification pour le patient et sa famille de ce que l'on pourrait trouver, incertitude du fait de l'incomplétude de nos connaissances ? Ne serait-il pas nécessaire de repenser le concept d'information du fait du caractère complexe de la situation ? Ici, la complexité réside aussi bien dans le fait que l'information disponible est parfois imparfaite (du point de vue de sa fiabilité, de sa précision ou de sa complétude) que dans les enjeux liés aux résultats obtenus, entachés d'importantes conséquences psychiques, émotionnelles, familiales et existentielles. Ne faudrait-il pas considérer que tout test diagnostique d'exploration étendu du génome contient des potentialités prédictives qui devraient être prises en considération avec les mêmes précautions relationnelles et temporelles que dans les approches présymptomatiques ?

Du point de vue de la réflexion éthique, il serait utile de s'interroger : faut-il transmettre l'information dans un souci d'exhaustivité en essayant de décliner tous les possibles ? C'est cette tendance que privilégie l'application de la loi. Mais, dans la relation avec le patient, un souci de sincérité, qui laisse de la place pour le doute et l'incertain, pourrait être une garantie supplémentaire à ce que le consentement recueilli résulte d'un réel exercice de l'autonomie d'un sujet correctement éclairé.

Le devoir d'information concerne aussi la procédure de rendu des résultats. Comment juger de la pertinence

et de l'utilité d'un résultat biologique de découverte fortuite? Que dire à propos de la caractérisation d'un variant génétique de signification inconnue? Parmi le flot d'informations disponibles, et eu égard à leur évolutivité, comment être certain que celles que l'on délivre sont valides et utiles pour le patient et sa famille? Faut-il envisager de les réactualiser pour les confirmer, les infirmer ou les compléter? Et si oui, quand et comment? Qui devra prendre à son compte (et sous sa responsabilité) le poids de l'incertitude généré : le biologiste, le clinicien ou le patient?

Tout ce qui est faisable doit-il nécessairement être fait, dans quels buts et avec quels « effets secondaires collatéraux » pour l'individu et pour la société?

Aujourd'hui, le recours aux NGS est en plein essor dans les domaines de la recherche et du diagnostic des maladies génétiques. Et dans les discours, en général enthousiastes, des généticiens, relayés abondamment par les revues spécialisées ou les médias généralistes, leur usage paraît devoir inéluctablement s'étendre, à court ou moyen terme, aux démarches de prévention (dépistage néonatal, diagnostic prénatal, préimplantatoire voire préconceptionnel) et au développement d'une médecine personnalisée.

Même s'ils ont de bonnes raisons de l'être, ces discours enthousiastes s'accompagnent parfois d'un brouillage des repères :

- ils mettent à jour la confusion qui règne (peut-être est-ce inévitable?) entre pratique de recherche et pratique diagnostique dans l'approche des maladies génétiques. Avec les NGS, on peut obtenir « dans la machine » un nombre considérable de données. Elles vont être filtrées pour identifier la mutation causale d'une affection génétique. Le rendement s'en trouve augmenté par rapport aux approches ciblées, aussi bien en diagnostic qu'en recherche. Que faire alors des données produites mais non exploitées? Ne pourraient-elles bénéficier, avec l'accord du patient, à la communauté scientifique pour l'acquisition de nouvelles connaissances? Dans ce cas, comment les conserver, les échanger, les exploiter le mieux possible, au service de la société et dans le respect des personnes? Est-on en mesure de rendre ces données anonymes dans un souci de confidentialité sans se priver d'informations indispensables à la recherche? En cas de découvertes potentiellement utiles

pour l'individu qui a contribué à cet effort de recherche, l'impossibilité de l'en informer ne serait-elle pas une perte de chance? Mais lui transmettre des résultats inattendus ne reviendrait-il pas à déroger au droit de rester dans l'ignorance?

- un autre niveau de confusion que révèlent les NGS se situe entre médecine prédictive et démarche de prévention. La médecine prédictive cherche à déterminer, parfois longtemps à l'avance, quelles maladies frapperont un sujet. Et ce indépendamment du fait que l'on puisse ou non agir pour contrer cette prédiction, c'est-à-dire indépendamment du fait qu'il existe ou non des moyens de prévention. Sommes-nous bien sûrs que le patient tirera plus de bénéfices que d'inconvénients d'une telle connaissance? Peut-on, sans risque, appliquer des données obtenues selon des modèles probabilistes à des individus? S'agit-il de prédire quelque chose de prédéterminé et d'irréremédiablement fixé ou plus simplement de prévoir ce qui pourrait arriver, en reconnaissant une marge d'incertitude, c'est-à-dire d'espoir? Comment prendre en compte la tension existentielle révélée par ces pratiques, mélange de plusieurs sentiments contradictoires : la tentation de savoir, l'espoir d'échapper au mal, la volonté de le combattre par tous les moyens, la peur de se sentir prisonnier de son destin, le désespoir face à la finitude...? Comment préserver l'autonomie et la liberté de choix des patients face, notamment, aux pressions de la médecine, de la société ou des industriels?

L'application prévisible de ces techniques au diagnostic prénatal et au diagnostic préimplantatoire réactive et amplifie toutes les questions éthiques dont ces pratiques ont fait l'objet depuis leur avènement. Peut-on juger des qualités d'une personne à partir de ces caractéristiques génétiques? Faut-il réserver ces approches aux situations à risque ou les étendre à l'ensemble de la population? Éviter la naissance du plus grand nombre possible de personnes malades ou handicapées, cela peut-il constituer un projet de santé publique justifiant le déploiement de tous les moyens disponibles à n'importe quel prix?

Le Comité consultatif national d'éthique aborde en partie ces questions dans l'avis 120 intitulé « Questions éthiques associées au développement des tests génétiques fœtaux sur sang maternel ». Dans la note de synthèse de cet avis, on peut lire à propos des tests fœtaux sur sang maternel par les techniques de NGS :

« En effet, la question est davantage d'estimer à quelles conditions de tels tests pourraient être utilisés que d'imaginer qu'ils pourraient ne pas l'être. Le fait que leur

contexte, technologique et économique, soit plutôt favorable (le coût du séquençage du génome entier est en continue et rapide diminution) n'autorise pas, néanmoins, à utiliser ces outils sans discernement ni considération des questionnements éthiques très importants qui peuvent en découler. Parmi ceux-ci, le CCNE met en avant un contexte sociétal où nombre de messages reçus relèvent de la stigmatisation du handicap et de son poids économique et social, du relatif rejet de la différence, voire de l'affirmation d'un droit à la bonne santé de l'enfant à naître.»

Conclusion

Les champs de réflexion éthique ne s'arrêtent pas là, nous ne pouvons les aborder tous. Citons pour mémoire la médecine personnalisée, les tests génétiques en accès direct ou les bio-banques.

Pour que ces technologies et les questions qu'elles soulèvent ne restent pas confinées dans un territoire de l'impensé, il paraît non seulement utile que les professionnels prennent le temps de s'entendre sur les nouvelles façons de faire induites par ces techniques, mais il est également nécessaire que puissent se construire, à leur propos, des modèles de décision partagée au sein de la société, incluant les décideurs politiques, les experts (en médecine, en sciences, en droit et en sciences humaines et sociales) sans oublier les citoyens.

ENTRAÎNEMENT 19 QROC

QROC 1

Définition de l'eugénisme.

QROC 2

À quelles conditions la loi autorise-t-elle le recours à l'interruption de grossesse pour motif médical ?

QROC 3

Définissez les missions des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN).

QROC 4

Comment mettre en œuvre les conditions d'une décision partagée au sein des CPDPN ?

QROC 5

Conditions pour un usage approprié des technologies d'exploration étendu du génome dans le cadre du diagnostic ?

Pour compléter sa réflexion

Avis du CCNE : www.ccne-ethique.fr/fr/type_publication/avis (avis n° 107 : avis sur les problèmes éthiques liés aux diagnostics anténatals : le diagnostic prénatal [DPN] et le diagnostic préimplantatoire [DPI]; avis n° 120 : questions éthiques associées au développement des tests génétiques fœtaux sur sang maternel)

Guidelines d'EuroGentest : www.eurogentest.org.

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies mitochondriales

Véronique Paquis-Flucklinger, Agnès Rötig

PLAN DU CHAPITRE

La mitochondrie	212
La chaîne respiratoire	212
Le génome mitochondrial	212
Les maladies mitochondriales	213
Génétique des maladies mitochondriales	215
Conclusion	219

La mitochondrie

La mitochondrie est un organite présent dans les cellules eucaryotes dont la taille est de l'ordre du micromètre. Elle est le siège de nombreuses réactions métaboliques et joue en particulier un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire par production d'ATP. Cette production est générée par la phosphorylation oxydative (OXPHOS, pour *Oxidative phosphorylation*) au niveau de la chaîne respiratoire. De ce fait, le nombre de mitochondries dans une cellule varie selon ses besoins énergétiques et d'un type cellulaire à un autre. Seules les hématies ne possèdent pas de mitochondries. La mitochondrie présente deux membranes qui délimitent deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. À certains niveaux, les deux membranes présentent des zones d'accolement transitoires où se déroulent des échanges entre le cytosol et la mitochondrie.

La membrane interne est constituée d'une bicouche lipidique et présente de nombreux replis appelés crêtes mitochondriales. Elle contient la chaîne respiratoire, siège de la phosphorylation oxydative. Pour produire de l'ATP, plusieurs voies métaboliques sont mises en jeu. Le glucose est converti en pyruvate à travers la glycolyse au niveau du cytosol. Ce pyruvate peut être converti en lactate ou pris en charge par la mitochondrie où il sera converti en acétyl coenzyme A (CoA). L'acétyl-CoA peut entrer dans le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs) et générer la production d'électrons riches en énergie, transportés par les protéines de transport du NADH et du FADH_2 . Alternativement, les acides gras et la glutamine peuvent également être utilisés comme substrats. La nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène (NADH) et la 1,5-dihydroflavine-adénine dinucléotide (FADH_2) alimentent le système de phosphorylation oxydative qui constitue la chaîne respiratoire.

La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire se compose de 4 complexes multi-enzymatiques [1] (figure 20.1) :

- le complexe I, NADH ubiquinone oxydoréductase, constitué de 46 sous-unités protéiques, est la porte d'entrée dans la chaîne respiratoire des électrons provenant du NADH de la matrice mitochondriale;
- le complexe II, succinate ubiquinone oxydoréductase, constitué de 4 sous-unités, est la porte d'entrée des électrons transportés par le FADH_2 ;

- le complexe III, ubiquinol cytochrome *c* réductase, est constitué de 11 sous-unités. Les électrons sont transportés des complexes I et II au complexe III grâce au coenzyme Q_{10} ou ubiquinone puis vont ensuite dans le complexe IV par le cytochrome *c*;
- le complexe IV, cytochrome *c* oxydase, constitué de 13 sous-unités, produit des molécules d'eau à partir de l'oxygène.

L'énergie apportée par le transport d'électrons est utilisée au niveau des complexes I, III et IV pour expulser des protons (H^+) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, ce qui permet d'établir un gradient de protons;

- enfin, le complexe V, ATP synthétase, est constitué de 16 sous-unités. Il utilise le gradient de protons pour produire de l'ATP. Le phénomène de phosphorylation oxydative permet l'établissement d'une liaison de forte énergie entre l'ADP et un ion phosphate.

Le génome mitochondrial

La mitochondrie possède son propre ADN, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Cette particularité est liée à son origine endosymbiotique d'une bactérie dans une cellule eucaryote primitive il y a 1,5 milliard d'années. L'ADNmt est une molécule circulaire double brin de 16569 paires de bases [2]. Le génome mitochondrial code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomaux (ARNr) et il présente plusieurs caractéristiques. Très compact, il se caractérise par une absence d'introns et l'existence d'une seule région non-codante d'une taille d'environ 1 kb appelée boucle de déplacement ou D-loop. La D-loop contient les séquences nécessaires à l'initiation de la réplication et de la transcription de l'ADNmt. Les deux brins de l'ADNmt sont différents, on distingue un brin lourd « H » (*heavy*) et un brin léger « L » (*light*). La majorité des gènes est portée par le brin H.

Le nombre de molécules d'ADNmt varie de 100 à plus de 1 000 copies par cellules, ce nombre de copies variant selon les besoins énergétiques de chaque type cellulaire. Les molécules d'ADNmt sont associées au sein de complexes nucléoprotéiques appelés nucléoïdes. Ces nucléoïdes permettent une protection et une compaction de l'ADNmt. Chez l'homme, on compte 2 à 10 copies d'ADNmt par nucléoïde et une trentaine de protéines associées à cette structure [3].

Le génome mitochondrial possède un code génétique spécifique différent du code génétique universel : 4 codons sur les 64 ont une signification différente de celle des mêmes codons

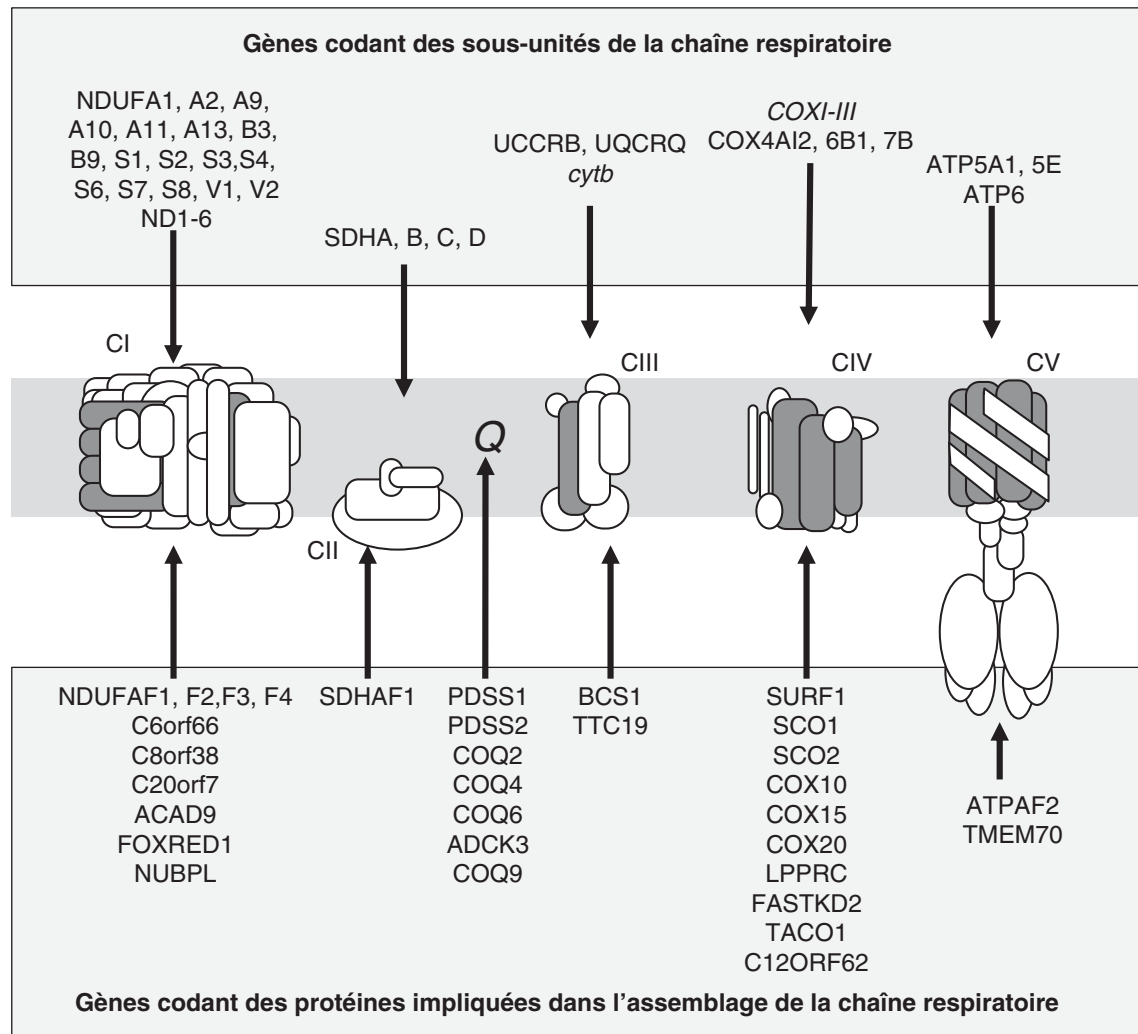
**Figure 20.1**

Schéma de la chaîne respiratoire et principaux gènes impliqués dans des maladies mitochondriales codant des sous-unités de la chaîne respiratoire (en haut) ou des facteurs d'assemblage (en bas).

dans le génome nucléaire. L'utilisation des codons est plus souple, tandis que 30 ARNt spécifient les acides aminés dans le cytosol, seuls 22 ARNt sont nécessaires pour la synthèse des protéines mitochondriales. Plusieurs molécules d'ARNt reconnaissent un des quatre nucléotides dans la troisième position.

Enfin la transmission de l'ADNmt n'est pas mendélienne mais maternelle. Toutes les mitochondries de la cellule œuf proviennent de l'ovule, les mitochondries du spermatozoïde sont dégradées lors de la fécondation. Toutes les autres protéines mitochondriales, y compris celles de la chaîne respiratoire, sont codées par des gènes nucléaires. Il existe environ 1 000 à 1 500 protéines dans la mitochondrie dont quelques centaines sont directement impliquées dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ces protéines sont des constituants des différents complexes de la chaîne respiratoire, des protéines impliquées dans l'assemblage

de ces complexes, la réplication, la transcription et la traduction de l'ADNmt, la synthèse de divers cofacteurs, la machinerie d'import des protéines codées par le génome nucléaire, par exemple.

Les maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales sont des maladies métaboliques liées à des déficits de la chaîne respiratoire [4]. Leur prévalence est estimée à 1 naissance pour 5 000, ce qui en fait la cause la plus fréquente de maladies métaboliques. La phosphorylation oxydative est une fonction ubiquitaire; les déficits de la chaîne respiratoire peuvent donc théoriquement affecter tous les organes ou tissus, à n'importe quelle période de la vie. Ces maladies sont associées

à des mutations de gènes nucléaires ou mitochondriaux et peuvent suivre tous les modes de transmission : autosomique dominant et récessif, lié à l'X et maternel. Ces pathologies sont donc caractérisées par une grande hétérogénéité génétique et clinique.

Présentations cliniques (tableau 20.1)

Un déficit de la phosphorylation oxydative peut être suspecté chez des patients présentant :

- une combinaison inexpliquée (association « illégitime ») de symptômes neuromusculaires ou non neuromusculaires [5, 6];
- une maladie d'évolution progressive;
- l'implication d'organes ou tissus sans fonction ou origine embryologique commune.

Les symptômes cliniques peuvent apparaître à n'importe quel âge et toucher n'importe quel organe, mais une caractéristique fréquente est l'augmentation progressive du nombre d'organes impliqués au cours de l'évolution

Tableau 20.1. Différentes présentations cliniques des maladies mitochondriales selon l'âge d'apparition des premiers symptômes.

	Signes cliniques
Période néonatale	Hypotonie et grande acidose lactique avec décès dans les premiers jours de vie ou évolution favorable puis dégradation entre 6 et 12 mois de vie
	Insuffisance hépatique dans les premières heures de vie, décès
	Syndrome de Leigh : encéphalomyopathie nécrosante)± myocardiopathie hypertrophique
	Syndrome de Barth : myocardiopathie dilatée + neutropénie cyclique chez les garçons
	Myopathie, myoglobulinurie
	Syndrome de Toni-Debré-Fanconi : tubulopathie proximale
Enfance (1 mois à 2 ans)	Syndrome de Leigh évoluant par poussées
	Régression psychomotrice, ataxie cérébelleuse, myoclonies, atteintes de la substance blanche, pseudo-accidents vasculaires
	Myopathie, myoglobulinuries récurrentes, myalgies
	Cassure staturo-pondérale à 6 mois, vomissements, diarrhées, atrophie villositaire, nanisme, autres
	Hépatomégalie, dysfonctionnement hépatocellulaire, syndrome d'Alpers, hypoglycémies
	Myocardiopathie hypertrophique
	Syndrome de Toni-Debré-Fanconi (tubulopathie proximale)
	Néphropathie tubulo-interstitielle plus rarement (et encéphalopathie)
	Syndrome de Pearson : anémie sidéroblastique, neutropénie, thrombopénie, le plus souvent associées à une insuffisance pancréatique externe
	Syndrome de Kearns-Sayre : ophtalmoplégie externe, rétinite pigmentaire, ptosis de la paupière, myopathie
Adolescence et âge adulte	Syndrome de Wolfram : diabète insulino-dépendant, diabète insipide, atrophie optique et surdité
	Pigmentation anormale des régions exposées au soleil, cheveux secs, trichodystrophie, autres
	Myoclonies, ataxie cérébelleuse, retard psychomoteur, leucodystrophie, atrophie corticale, neuropathie, pseudo-accidents vasculaires, migraines
	Myopathie, faiblesse musculaire à l'effort, myoglobulinuries récurrentes
	Myocardiopathie hypertrophique ou dilatée, bloc cardiaque
	Diabète insulino- et non insulino-dépendant + surdité
	Surdité neurosensorielle + diabète
	Syndrome de Kearns-Sayre : ophtalmoplégie externe, rétinite pigmentaire, ptosis de la paupière, myopathie
	Syndrome MNGIE (<i>myo-neuro-gastro-intestinal encephalopathy</i>) : pseudo-obstruction intestinale avec neuropathie et myopathie
	Déficit en hormone de croissance, hypoparathyroïdisme, hyperaldostérionisme

de la maladie. Cette augmentation est indépendante de l'âge d'apparition et de la présentation clinique. Le type de présentation des maladies mitochondriales est multiple; il peut être notamment neurologique, musculaire, cardiaque, hépatique, métabolique, hématologique, etc.

Investigation métabolique

Le bilan métabolique vise à évaluer le statut d'oxydoréduction dans le cytoplasme et les mitochondries. Une acidose métabolique avec hyperlactatémie persistante ($> 2,5$ mM), associée à une élévation du rapport lactate (L)/pyruvate (P) ($L/P > 20$) et une élévation du rapport des corps cétoniques 3-hydroxybutyrate (3-OHB)/acétoacétate (AcAc) ($3\text{-OHB}/\text{AcAc} > 2$) font suspecter une maladie mitochondriale, notamment en période néonatale. L'acidose est due à l'accumulation d'équivalents réduits comme le NADH et le FADH, qui pousse à la transformation de l'acétoacétate en 3-hydroxybutyrate entraînant ainsi l'élévation du rapport 3-OHB/AcAc dans la mitochondrie. De même, dans le cytoplasme, la transformation du pyruvate en lactate est favorisée et le rapport L/P s'élève. Ce phénomène est amplifié en période postprandiale où la production de pyruvate est accrue par l'oxydation des substrats glycolytiques.

Investigation enzymologique

Le diagnostic de maladie mitochondriale repose sur l'étude enzymatique des différents complexes de la chaîne respiratoire à partir de mitochondries isolées du ou des tissus atteints. L'étude de la chaîne respiratoire mitochondriale se fait par des techniques polarographiques (qui mesurent la respiration cellulaire) et/ou spectrophotométriques (qui mesurent l'activité enzymatique des différents complexes de la chaîne respiratoire). Ces techniques sont réalisées à partir de mitochondries isolées de muscle, de foie, de cœur, de fibroblastes, etc. L'étude spectrophotométrique est également possible à partir de microbiopsies de tissu myocardique, hépatique, rénal et intestinal.

Investigation histologique

L'analyse du muscle en microscopie optique peut permettre d'orienter le diagnostic en mettant en évidence une accumulation lipidique, la présence de fibres COX négatives en immunohistochimie et/ou de fibres rouges déchiquetées (ou *ragged-red fibers*) par coloration au trichrome de Gomori, très caractéristiques de myopathie mitochondriale mais rarement retrouvées chez l'enfant. L'étude en microscopie électronique peut identifier des mitochondries anor-

males avec désorganisation des crêtes et des inclusions paracristallines.

Génétique des maladies mitochondriales

Le diagnostic de maladie mitochondriale est difficile et seule l'identification de l'anomalie génétique permet de le confirmer. La stratégie d'identification du gène en cause est complexe du fait de la double origine mitochondriale et nucléaire de la chaîne respiratoire et de l'absence de corrélation génotype/phénotype dans la grande majorité des cas [7]. De nombreux gènes nucléaires sont impliqués, dont une grande partie est encore inconnue à ce jour. L'investigation génétique est menée en tenant compte de l'atteinte clinique du patient et du déficit enzymatique. Dans plusieurs cas, les caractéristiques de l'IRM cérébrale permettent d'orienter précisément vers le(s) gène(s) à tester.

Mutations de l'ADN mitochondrial (tableau 20.2)

Il existe trois catégories majeures d'altérations de l'ADNmt, les mutations ponctuelles, les délétions et les déplétions [8]. Dans la plupart des cas, les mutations de l'ADNmt sont hétéroplasmiques, ce qui correspond à la coexistence de molécules d'ADNmt normales et mutées. Dans ces cellules, le phénotype est le reflet de la proportion de molécules d'ADNmt mutées et de la manière dont les molécules normales sont capables de compenser le déficit engendré par la mutation (effet seuil).

Mutations ponctuelles de l'ADNmt

Les mutations ponctuelles conduisent soit à des changements d'acides aminés de protéines de la chaîne respiratoire, soit à des mutations dans les gènes d'ARNt et ARNr.

Les deux principales mutations d'ARNt sont les mutations m.3243A>G au niveau de l'ARNt^{Leu(UUR)} (gène *MT-TL1*) et m.8344A>G au niveau de l'ARNt^{Lys} (gène *MT-TK*) et sont associées respectivement aux syndromes MELAS (pour *mitochondrial encephalopathy lactic acidosis stroke-like episodes*) et MERRF (pour *myoclonic epilepsy with ragged-red fibers*). Les mutations les plus fréquentes localisées dans des gènes codant pour des protéines de structure ont été rapportées dans l'atrophie optique de Leber (*Leber hereditary optic neuropathy* ou LHON) et les syndromes de Leigh/NARP (*neuropathy, ataxia, retinis pigmentosa*).

Tableau 20.2. Maladies mitochondriales associées à des anomalies de l'ADNmt.

Syndromes	Anomalie de l'ADNmt	Mode de transmission	Phénotypes cliniques
Syndrome de Kearns-Sayre	Délétion unique	S	Ptosis, ophtalmoplégie, myopathie, rétinite pigmentaire, trouble de la conduction cardiaque
Syndrome de Pearson	Délétion unique	S	Anémie sidéroblastique avec vacuolisation des précurseurs, neutropénie, thrombopénie, insuffisance pancréatique externe
Atrophie optique de Leber (LHON)	Mutation ponctuelle	M	Début vers 25 ans, perte brutale de la vision évoluant vers une atrophie optique
Syndrome MERRF	Mutation ponctuelle	M	Encéphalomyopathie avec myoclonies, ataxie, surdité et faiblesse musculaire
Syndrome MELAS	Mutation ponctuelle	M	Début dans l'adolescence, migraines récurrentes, vomissements, faiblesse musculaire, pseudo-accidents vasculaires cérébraux, acidose lactique
Syndrome NARP	Mutation ponctuelle	M	Faiblesse musculaire neurogène, ataxie, rétinite pigmentaire et neuropathie sensorielle, convulsions, encéphalopathie
Diabète-surdité	Mutation ponctuelle Délétion	M M	Diabète-surdité
Syndrome de Leigh et déficit du complexe I	Mutation ponctuelle	M	Encéphalopathie subaigüe avec régression psychomotrice, débutant en général avant 1 an et évoluant par poussées

LHON : Leber hereditary optic neuropathy; MERRF : myoclonic epilepsy ragged-red fibers; MELAS : mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke-like episodes; NARP : neuropathy ataxia and retinis pigmentosa; S : sporadique; M : maternelle.

Délétions de l'ADNmt

La seconde catégorie de défaut de l'ADNmt est constituée par les réarrangements de grande taille, délétion unique ou délétion-duplication. Bien que la taille et la position de ces délétions diffèrent d'un patient à l'autre, elles englobent généralement plusieurs gènes codant des protéines et des ARNt. Ces délétions se retrouvent la plupart du temps dans des cas sporadiques, elles sont hétéroplasmiques, généralement « tissu-spécifiques ». Si ces réarrangements sont présents dans plusieurs tissus, on retrouve la même délétion dans les différents tissus d'un malade comme, par exemple, dans le syndrome de Pearson. Les délétions apparaissent quasiment toujours entre des séquences répétées directes suggérant un réarrangement *de novo* apparu durant l'ovogénèse ou le développement précoce. Ces réarrangements de grande taille de l'ADNmt sont à l'origine de plusieurs syndromes, le syndrome de Kearns-Sayre, le syndrome de Pearson ou l'ophtalmoplégie progressive externe. Des délétions multiples de l'ADNmt peuvent également être retrouvées dans le muscle. Dans ce cas, ces anomalies qualitatives sont la conséquence de mutations dans des

gènes nucléaires, impliqués dans le maintien de l'ADNmt, et se transmettent selon un mode mendélien (voir ci-dessous « Gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt »).

Déplétion de l'ADNmt

Les déplétions de l'ADNmt sont des anomalies quantitatives de l'ADNmt et ne s'accompagnent pas de mutations ponctuelles ou de délétions. Elles sont à transmission autosomique récessive et sont dues à des mutations dans des gènes nucléaires impliqués dans le maintien de l'ADNmt (voir ci-dessous « Gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt »).

Mutations de gènes nucléaires (tableau 20.3)

Le nombre de mutations dans des gènes nucléaires impliquées dans des maladies mitochondriales augmente continuellement. Elles représentent probablement la vaste majorité des déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Tableau 20.3. Liste non exhaustive des principaux gènes nucléaires connus à ce jour comme impliqués dans des maladies mitochondriales.

Gène		Phénotype clinique	Transmission
Gènes de structure de la CR			
Complexe I	NDUFS1, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFA10, NDUFV1, NDUFV2, NDUFS2, NDUFA2, etc.	LS, pathologie néonatale létale Encéphalomyopathie ± cardiopathie	AR
	NDUFA1		Liée à l'X
Complexe II	SDHA SDHB, SDHC, SDHD	LS Pheochromocytomes et paragangliomes familiaux	AR AD
Complexe III	UQCRB, UQCRQ	Acidose lactique + hypoglycémie/encéphalopathie avec atteinte extrapyramidale	AR
Complexe IV	COX6B1	Encéphalomyopathie infantile	AR
Gènes impliqués dans l'assemblage de la CR			
Complexe I	NDUFAF1, NDUFAF2, C6orf66, C20orf7, etc.	Encéphalopathie précoce ± myopathie, cardiopathie, pathologie néonatale létale	AR
Complexe II	SDHAF1	Leucoencéphalopathie	AR
Complexe III	BCS1L, TTC19	Encéphalopathie et tubulopathie, LS, GRACILE/ataxie cérébelleuse	AR
Complexe IV	SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15, TACO1, LRPPRC, FASTKD2, etc.	LS Encéphalomyopathie néonatale ± hépatopathie, cardiopathie, tubulopathie	AR
Complexe V	ATP12, TMEM70 AIFM1	Encéphalopathie ± acidurie méthylglutaconique ou cardiopathie Encéphalomyopathie	AR Liée à l'X
Gènes impliqués dans la traduction mitochondriale			
Mitochondosome	MRPS16 MRPS22	Acidose lactique néonatale fatale, agénésie du CC et dysmorphie Cardiomyopathie, oedème cutané et tubulopathie	AR
Maturation des ARNt mitochondriaux	PUS1, YARS2, DARS2, etc. TRMU, etc.	MLASA, LBSL Atteinte hépatique	AR
Facteurs d'élongation	EFTu EFTs, EFG1	Leucodystrophie infantile macrokystique avec micropolygyrie Encéphalomyopathie ± cardiopathie, hépatopathie, acidose lactique	AR
Gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt			
	POLG1, POLG2, PEO1, ANT1, OPA1, RRM2B, MFN2	AdPEO ± autres signes : neuropathie, parkinsonien, AO, etc.	AD
	POLG1	ArPEO ± autres signes : épilepsie, ataxie, neuropathie, parkinsonien, AO, etc.	AR
	TP	MNGIE	AR
	POLG1, PEO1, DGUOK, MPV17	Atteinte hépatocérébrale infantile, syndrome d'Alpers	AR
	TK2, RRM2B	Myopathie avec déplétion très sévère	AR
	SUCLG1, SUCLA2	Encéphalopathie néonatale avec acidémie méthylmalonique	AR
	CHCHD10	Ataxie, démence frontotemporale, atteinte du motoneurone, myopathie	AD

CR : chaîne respiratoire; AR : autosomique récessif; AD : autosomique dominant; LS : syndrome de Leigh; MLASA : myopathie avec acidose lactique et anémie sidéroblastique; LBSL : leucoencéphalopathie avec atteinte médullaire et du tronc cérébral et élévation du lactate; GRACILE : retard de croissance intra-utérin, aminoacidurie, cholestase, surcharge en fer, acidose lactique et décès précoce; AdPEO : ophtalmoplégie progressive externe de transmission autosomique dominante; ArPEO : ophtalmoplégie progressive externe de transmission autosomique récessive; AO : atrophie optique; MNGIE : myopathie avec ophtalmoplégie, neuropathie, gastro-intestinale encéphalopathie.

Gènes de structure des sous-unités de la chaîne respiratoire

Les différents gènes nucléaires codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire ont tous été identifiés et des mutations de plusieurs de ces gènes ont été trouvées chez certains patients. La plupart des mutations identifiées sont rencontrées dans des gènes codant pour le complexe I tandis que très peu de mutations ont été trouvées dans des gènes codant pour les autres complexes (figure 20.1).

Gènes d'assemblage de la chaîne respiratoire

Le fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale nécessite une intégrité structurale et une régulation fine de chacune des sous-unités et des cofacteurs. La moindre altération d'un de ces mécanismes permettant le maintien de cette intégrité de structure peut entraîner un dysfonctionnement ou une instabilité de l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Une partie des facteurs d'assemblages a été identifiée chez l'homme par étude de leurs homologues chez la levure (figure 20.1).

Gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt

Des mutations de gènes nucléaires impliqués dans la réplication ou le maintien de l'ADNmt peuvent entraîner des anomalies quantitatives (déplétions) ou qualitatives (délétions multiples) de l'ADNmt, telles que citées précédemment. Elles conduisent à un déficit multiple de la chaîne respiratoire. Ces anomalies ont une transmission mendélienne dominante ou récessive. Elles sont majoritairement causées par des enzymes impliquées directement dans la réplication/réparation de l'ADNmt ou par des déficits au niveau du *pool* de nucléotide nécessaire à la synthèse d'ADNmt.

Anomalies quantitatives de l'ADNmt (déplétions)

Les déplétions de l'ADNmt surviennent en période néonatale ou dans l'enfance et sont associées à des pathologies hétérogènes [9]. La forme hépatocérébrale associant une atteinte hépatique précoce (cytolyse, insuffisance hépatocellulaire, cholestase) et une hypotonie axiale, sont dues à des mutations dans les gènes *DGUOK* codant pour la désoxyguanosine kinase, *POLG* codant pour l'ADN polymérase gamma mitochondriale et *MPV17* de fonction inconnue. On trouve également des mutations dans le gène *TK2* codant pour la thymidine kinase 2, qui entraînent

une myopathie précoce et très sévère avec déplétion dans le muscle squelettique.

Anomalies qualitatives de l'ADNmt (délétions multiples)

Les pathologies mitochondriales causées par des délétions multiples de l'ADNmt présentent majoritairement une transmission mendélienne autosomique dominante et apparaissent chez le sujet adulte. Elles sont caractérisées par une ophtalmoplégie externe progressive, un ptosis et une faiblesse progressive des muscles extra-oculaires et squelettiques à des degrés variables. Elles sont causées par des mutations dans les gènes *POLG* et *POLG2* codant respectivement pour les sous-unités *POLG-α* et *POLG-β* de la polymérase mitochondriale, *ANT1* codant pour l'isoforme musculaire du translocateur des adénylates, *C10ORF2/PEO1* codant pour l'hélicase mitochondriale *TWINKLE* et *OPA1* codant pour une GTPase de la membrane interne mitochondriale [11].

Anomalies de synthèse des protéines mitochondriales

La synthèse des protéines codées par le génome mitochondrial se fait exclusivement par la machinerie de traduction mitochondriale. Ce processus est complexe et spécifique à la mitochondrie. Il fait intervenir 22 ARNt et 2 ARNr codés par le génome mitochondrial mais aussi plus d'une centaine de protéines codées par le génome nucléaire, les protéines ribosomales mitochondriales, des enzymes de modification des ARNt et ARNr, des aminoacyl-ARNt synthétases et des facteurs d'élongation et de terminaison de la traduction. Des mutations dans plusieurs de ces facteurs ont été rapportées chez des patients présentant des déficits multiples de la chaîne respiratoire avec des présentations cliniques variées [12].

Exploration moléculaire : intérêt du séquençage de nouvelle génération

Dans la majorité des centres, la stratégie d'exploration des maladies mitochondriales reposait sur la recherche de délétion, de déplétion et des mutations les plus fréquentes de l'ADNmt à partir d'un prélèvement tissulaire. La recherche non ciblée de mutations par technique de séquençage classique (méthode de Sanger) ne permettait pas de dépister les mutations lorsque le taux d'hétéroplasie était inférieur à 20 % [13]. En l'absence d'altérations de l'ADNmt, la deuxième étape consistait à analyser les gènes

nucléaires candidats. On connaît actuellement environ 200 gènes dont les mutations conduisent à une maladie mitochondriale avec un nombre de gènes candidats supérieur à 1 000. La stratégie consistait en une analyse séquentielle en fonction de l'histoire clinique du patient et du bilan réalisé. Par exemple, plus d'une dizaine de gènes sont responsables de déplétion et en cas d'atteinte hépatique les gènes *DGUOK*, *POLG* et *MPV17* doivent être analysés en priorité. Néanmoins, chez la majorité des patients, le gène responsable restait inconnu.

Le séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing* ou NGS (voir [chapitre 11, «Le séquençage de nouvelle génération»](#)), permet aujourd'hui une analyse exhaustive de l'ADNmt, y compris en cas de faible taux d'hétéroplasmie. Il permet également l'étude simultanée d'un panel de gènes (NGS ciblé), ou de l'ensemble des régions codantes du génome (séquençage d'exome). Ces nouvelles technologies sont particulièrement adaptées aux maladies mitochondriales de par l'hétérogénéité génétique qui les caractérise et devraient permettre un diagnostic génétique rapide avec un coût raisonnable [14].

Conclusion

Outre la confirmation du diagnostic, l'identification du gène et des mutations responsables permet de proposer un conseil génétique et un diagnostic prénatal (DPN), voire un diagnostic préimplantatoire (DPI). En cas de mutation dans un gène nucléaire, DPN ou DPI peuvent être réalisés dans de très bonnes conditions de fiabilité. En cas de mutation de l'ADNmt, le risque de faux négatif lié à la faible hétéroplasmie peut conduire à proposer un don d'ovocytes. La mise en place du NGS pour l'analyse de l'ADNmt et des

gènes nucléaires va permettre d'améliorer le diagnostic et la compréhension de la physiopathologie des maladies mitochondriales grâce à l'identification de nouveaux gènes.

Références

- [1] Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 1985; 54 : 1015–69.
- [2] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290 : 457–65.
- [3] Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 2008; 283 : 3665–75.
- [4] Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006; 368 : 70–82.
- [5] Munnich A, Rötig A, Chretien D, et al. Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; 155 : 262–74.
- [6] Chausseuot A, Paquis-Flucklinger V. An overview of neurological and neuromuscular signs in mitochondrial diseases. *Rev Neurol* 2014; 170 : 323–38.
- [7] Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 2013; 106 : 135–59.
- [8] Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 : D823–8.
- [9] Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial inter-genomic communication. *Biosci Rep* 2007; 27 : 39–51.
- [10] Ferrari G, Lamantea E, Donati A, et al. Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA. *Brain* 2005; 128 : 723–31.
- [11] Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med* 2008; 59 : 131–46.
- [12] Rotig A. Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1807; 2011 : 1198–205.
- [13] Bannwarth S, Procaccio V, Lebre AS, et al. Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders. *J Med Genet* 2013; 50 : 704–14.
- [14] Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2013; 13 : 379–87.

ENTRAÎNEMENT 20 QCM-QCS

QCM 1

Une maladie mitochondriale :

- A. Est définie par un déficit de la chaîne respiratoire
- B. Est uniquement transmise selon un mode maternel
- C. N'est jamais transmise selon un mode mendélien
- D. Peut affecter tous les organes et tous les tissus
- E. Peut se manifester à tout âge de la vie

QCM 2

La chaîne respiratoire mitochondriale :

- A. Est le siège de la phosphorylation oxydative
- B. Permet la production d'ATP par phosphorylation de l'ADP
- C. Permet la respiration cellulaire
- D. Est constituée de 5 complexes enzymatiques fonctionnant tous comme des transporteurs d'électrons
- E. Est sous le contrôle exclusif de l'ADNmt

QCM 3

Le génome mitochondrial

- A. Est une molécule linéaire double brin de 16569 paires de bases
- B. Est uniquement transmis par les mères
- C. Code pour l'ensemble des sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire
- D. Peut être porteur de mutations à l'état hétéroplasmique
- E. Toutes les propositions sont fausses

QCM 4

Le diagnostic d'une maladie mitochondriale :

- A. Est suspecté sur un rapport lactate/pyruvate augmenté
- B. Est confirmé par une IRM cérébrale anormale
- C. Est confirmé par l'identification d'un défaut d'activité d'un ou de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire
- D. Est suspecté devant une association illégitime de symptômes
- E. Est confirmé par l'identification de l'anomalie moléculaire responsable

QCM 5

Un enfant présente une maladie mitochondriale secondaire à une mutation homozygote dans le gène *SURF1*, qui code un facteur d'assemblage du complexe IV.

- A. La transmission de la maladie dans cette famille se fait selon un mode maternel
- B. Ce résultat permet de proposer un diagnostic prénatal fiable aux parents en cas de future grossesse

- C. Ce résultat ne permet pas de proposer un diagnostic prénatal fiable à cause du risque d'hétéroplasmie
- D. Le risque d'avoir un nouvel enfant malade pour les parents en cas de future grossesse est de 1/4
- E. Ce résultat permet de donner aux parents un conseil génétique fiable

QCM 6

Les gènes nucléaires responsables de maladies mitochondriales :

- A. Codent des ARN ribosomiaux (ARNr) et des ARN de transfert (ARNt)
- B. Ne codent pas des sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire, qui sont sous contrôle de l'ADNmt
- C. Codent des facteurs d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire
- D. Codent des enzymes de modification des ARNt et ARNr
- E. Codent des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADNmt

QCM 7

Les altérations de l'ADNmt responsables de maladies mitochondriales :

- A. Peuvent être des délétions uniques comme dans le syndrome de Kearns-Sayre
- B. Peuvent siéger dans des gènes codant des ARNt
- C. Sont retrouvées dans toutes les cellules de l'organisme
- D. Peuvent siéger dans des gènes codant des sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire
- E. Toutes les propositions sont fausses

QCS 1

Concernant le diagnostic moléculaire d'une maladie mitochondriale :

- A. L'absence d'une mutation de l'ADNmt à partir d'un prélèvement sanguin permet d'éliminer la responsabilité du génome mitochondrial
- B. Le séquençage haut débit n'est pas indiqué à cause de l'hétérogénéité génétique de ces maladies
- C. La recherche de mutations de l'ADNmt se fait généralement à partir d'un prélèvement tissulaire
- D. La recherche de mutations dans des gènes nucléaires doit se faire à partir d'un prélèvement tissulaire
- E. Il est toujours réalisé à partir d'une biopsie musculaire

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : l'empreinte génomique parentale et maladies associées

Patrick Edery

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	222
Gènes soumis à empreinte	222
Cycle de l'empreinte au cours de la vie	224
Mécanismes de lecture de l'empreinte	225
Évolution	225
Épimutations, clonage et reprogrammation	226
Empreinte parentale et pathologies humaines	226
Perspectives	229



L'essentiel à retenir

L'empreinte génomique parentale est un mécanisme physiologique d'inactivation de l'un des deux allèles de certains gènes en fonction de leur origine parentale, conduisant à une hémizygotie fonctionnelle. Certains gènes sont soumis à une empreinte paternelle, c'est-à-dire qu'ils sont physiologiquement inactifs sur le chromosome d'origine paternelle, d'autres sont soumis à une empreinte maternelle, qui les inactive sur le chromosome d'origine maternelle. L'empreinte parentale résulte d'une marque épigénétique apposée sur certaines régions du génome, dans les cellules germinales de l'organisme. Les gènes soumis à empreinte parentale jouent un rôle dans la croissance fœtale et postnatale, le comportement et le développement de certaines tumeurs.

Introduction

Le concept d'empreinte génomique a été découvert chez les mammifères au début des années 1980 à la lumière de deux types d'expériences menées chez la souris. Tout d'abord, la transplantation de pronoyaux a permis de fabriquer des embryons comportant un génome diploïde totalement monoparental (e-figure 21.1). D'autre part, d'autres techniques ont permis de créer des embryons qui avaient hérité de deux copies de certains chromosomes entiers (ou de certaines régions chromosomiques) issu(e)s d'un seul parent (disomie uniparentale, figure 21.2). Dans les deux cas, on a constaté que certains gènes avaient une fonction différente selon qu'ils provenaient du père ou de la mère [1, 2].

Au cours des années 1990, les premiers gènes soumis à empreinte furent découverts et la démonstration de l'implication de gènes soumis à empreinte dans certaines pathologies humaines fut apportée. On démontra également le rôle de la *méthylation de l'ADN* dans le mécanisme de l'empreinte. La méthylation est une marque apposée sur l'ADN, différente selon qu'il s'agit de l'ovocyte ou du spermatozoïde, transmise de façon clonale aux cellules filles et qui conditionne l'expression des gènes [3].

Ultérieurement, des progrès importants ont été effectués dans la compréhension des conséquences phénotypiques des anomalies de l'empreinte parentale, en particulier sur la croissance fœtale et sur le comportement après la naissance; certaines séquences agissant en *cis* ont été impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes correspondants. Par ailleurs, l'étude de l'empreinte génomique parentale a apporté de nouvelles informations sur le rôle des mécanismes épigénétiques dans le développement embryonnaire normal et pathologique.

Dans ce chapitre, nous discuterons les mécanismes de l'apposition et du maintien de l'empreinte, les mécanismes de lecture de l'empreinte qui aboutissent à une expression génique différentielle, les aspects évolutifs de l'empreinte et les conséquences de l'empreinte sur le clonage reproductif, qui fait intervenir la reprogrammation du génome. Enfin, nous traiterons les conséquences phénotypiques physiologiques et pathologiques (syndromes génétiques) de l'empreinte.

Gènes soumis à empreinte

Chez la souris, les gènes soumis à empreinte ont été identifiés de différentes façons :

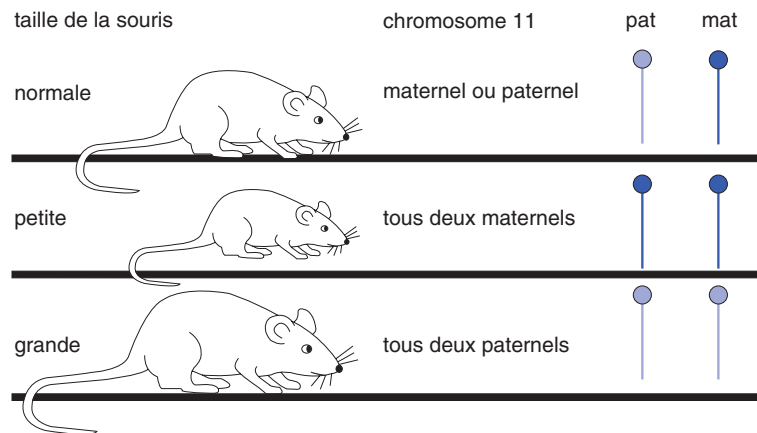
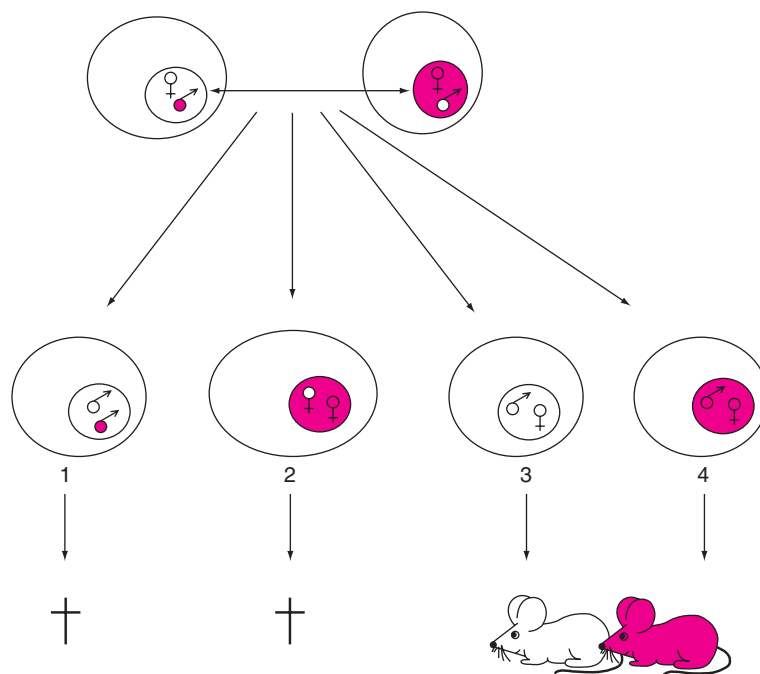


Figure 21.2

Disomie uniparentale.

Les souris ayant hérité des deux chromosomes 11 maternels sont hypotrophiques; les souris ayant hérité des deux chromosomes 11 paternels sont hypertrophiques, démontrant que certains gènes situés sur le chromosome 11 n'ont pas le même effet sur la croissance selon le parent transmetteur du chromosome 11.



e-figure 21.1

Complémentarité fonctionnelle des génomes parentaux.

Les zygotes de départ sont obtenus à partir d'un croisement de deux lignées murines différentes, l'une représentée en rouge, l'autre en blanc. L'échange du pronoyau femelle d'un œuf fécondé avec le pronoyau mâle d'un autre œuf fécondé permet d'obtenir des embryons diploïdes uniparentaux paternels (embryon androgénote, 1) et maternels (embryon gynogénote, 2). En revanche, si l'on échange entre eux les deux pronoyaux paternels, les embryons ainsi obtenus conservent un génome biparental (3) et (4). Seuls les embryons possédant un génome biparental donnent des nouveau-nés viables.

- par inactivation ciblée (*knock-out*) conduisant à un phénotype dépendant de l'origine parentale de la mutation;
- par l'identification de leur position (à proximité d'autres gènes soumis à empreinte parentale ou dans une région chromosomique dont les remaniements engendrent une pathologie attribuée à une anomalie de l'empreinte);
- par l'étude systématique des phénotypes des embryons porteurs de disomies uniparentales pour certains chromosomes ou régions chromosomiques.

Chez la souris, environ 150 gènes soumis à empreinte ont été identifiés à ce jour et la moitié de ces gènes ont été identifiés chez l'homme. Pour quelques-uns de ces gènes seulement, l'état de l'empreinte est le même chez les marsupiaux, chez la souris et chez l'homme.

Actuellement, les stratégies de séquençage haut débit sont de plus en plus utilisées et ont, par exemple, récemment permis de générer des cartes de haute résolution des régions génomiques dans lesquelles les profils de méthylation sont spécifiquement dépendants de l'origine parentale de l'allèle [4].

Caractéristiques génétiques et épigénétiques des gènes soumis à empreinte

Les gènes soumis à empreinte sont rarement isolés sur le génome : près de 80 % d'entre eux sont organisés en *clusters* (groupes) de gènes. Cette organisation témoigne de la régulation coordonnée de l'ensemble des gènes d'un domaine chromosomique. Effectivement, des éléments (séquences d'ADN) de contrôle régional de l'empreinte (ICR, pour *imprinting control regions*) ont été découverts dans certains *clusters*. De façon analogue, il existe un centre de contrôle de l'inactivation du chromosome X.

Caractéristiques des régions des gènes soumis à empreinte

Trois caractéristiques générales des séquences génomiques voisines des gènes soumis à empreinte ont été observées :

- près de 90 % des gènes soumis à empreinte possèdent des îlots CpG (séquences cytosine-guanine en *cis*), alors que moins de la moitié des gènes en moyenne en possèdent. Ces îlots sont des séquences d'ADN situées en 5' des gènes, s'étendant sur plus de 500 paires de bases et possédant une densité élevée de séquences CpG;
- de plus, des éléments transposables de type *LINE* (*long interspersed nuclear elements*) sont fréquemment observés à proximité des (ou dans ces) îlots CpG;
- enfin, des motifs de liaison pour la protéine CTCF (nommée également *CCCTC-binding factor*), qui fonctionnent

soit comme activateurs transcriptionnels, soit comme répresseurs transcriptionnels selon le contexte, sont fréquemment rencontrés dans ces régions [5].

Méthylation

La grande majorité des gènes soumis à empreinte connus à ce jour présentent une différence de méthylation de l'ADN entre les deux allèles parentaux; toutefois, ces régions méthylées de façon différentielle appelées ICR ou centres d'empreinte peuvent avoir des propriétés variables. Par exemple, la méthylation différentielle dans certaines ICR est introduite dans les cellules germinales parentales et maintenue pendant toute la durée du développement et dans *tous les tissus*. Dans d'autres ICR, on observe des modifications de l'état de méthylation de l'ADN au cours du développement et des profils de méthylation *spécifiques des tissus considérés*. Les ICR sont habituellement méthylées sur la copie inactive du gène (figure 21.3). Le profil

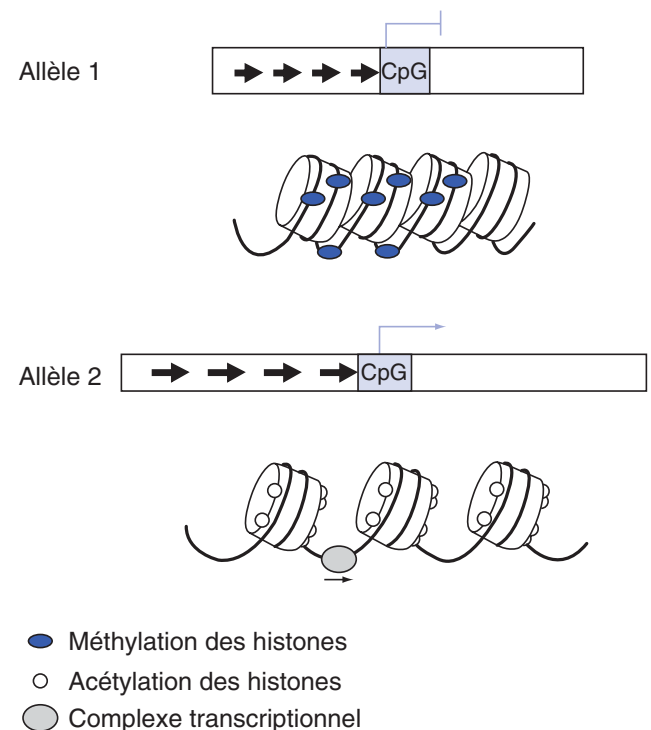


Figure 21.3

Caractéristiques des gènes soumis à empreinte.

Les deux allèles d'un gène soumis à empreinte sont représentés. Les caractéristiques des gènes soumis à empreinte : îlots CpG et répétitions directes (flèches) sont indiqués. La région agrandie sous les chromosomes montre les modifications épigénétiques comme la condensation du nucléosome par déacétylation et méthylation des histones (allèle 1) et l'ouverture de la chromatine par acétylation et déméthylation (allèle 2). L'activité transcriptionnelle de l'allèle 2 est représentée par un complexe transcriptionnel.

de méthylation des ICR, qui conditionne l'expression des gènes soumis à empreinte, s'accompagne de changements de la conformation chromatinienne et de modifications biochimiques des histones (par exemple acétylations).

Profils de réplication

L'ADN des régions soumises à empreinte a une réplication asynchrone durant la phase S du cycle cellulaire. Pour la majorité de ces régions, c'est la copie paternelle qui est répliquée plus précocement que la copie maternelle [6]. Toutefois, les gènes exprimés sur la copie maternelle et les gènes exprimés sur la copie paternelle sont parfois situés dans les mêmes régions.

Recombinaisons méiotiques

Dans les *clusters* de gènes soumis à empreinte, ou à proximité de ceux-ci, le taux de recombinaison est plus important au cours de la méiose masculine que lors de la méiose féminine.

Nature de l'empreinte génomique

La méthylation *de novo* de l'ADN et la déacétylation des histones sont des mécanismes simultanés lors de l'apposition de l'empreinte, qui conduisent à l'extinction de l'expression des gènes. L'importance de la méthylation de l'ADN dans le maintien de l'empreinte est également clairement établie. L'expression des gènes soumis à empreinte est le résultat de la lecture de l'empreinte dans les tissus somatiques.

Cycle de l'empreinte au cours de la vie

L'empreinte génomique se modifie au cours de la vie de l'organisme. Une empreinte spécifique des spermatozoïdes est apposée dans la lignée germinale mâle et une empreinte spécifique des ovocytes est apposée dans la lignée germinale femelle pendant la différenciation des cellules germinales. Après la fécondation, l'empreinte est maintenue pendant la réplication et la ségrégation des chromosomes dans l'organisme en développement. Dans les cellules somatiques, l'empreinte est maintenue, mais elle peut être modifiée au cours du développement dans certains tissus. L'empreinte est ensuite lue, conduisant à une expression spécifique de l'origine parentale du gène. Dans les cellules germinales du nouvel organisme, l'empreinte est effacée à un stade précoce. La lignée germinale a donc le rôle de remise à zéro

des empreintes. Après ce stade, survient l'apposition d'une nouvelle empreinte dans la cellule germinale, spécifique du sexe du futur parent.

Effacement de l'empreinte

Pendant l'effacement de l'empreinte dans les cellules germinales, on observe une déméthylation marquée et apparemment étendue à tout le génome dans les deux sexes (e-figure 21.4). Toutes les empreintes sont effacées à cette étape, ce qui implique en particulier que les empreintes héritées d'un parent du même sexe que l'embryon en développement ont également été effacées.

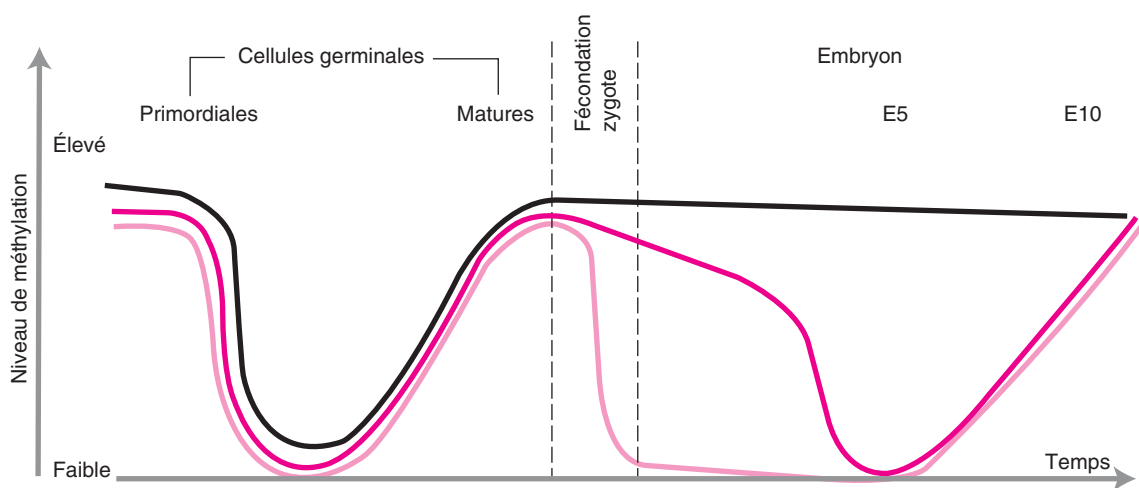
Apposition de l'empreinte

Après l'effacement de l'empreinte, la méthylation *de novo* débute dans les deux lignées germinales et se poursuit après la naissance (e-figure 21.4). La méthylation survient pendant la croissance des ovocytes, qui sont en arrêt méiotique, alors qu'elle survient avant la méiose durant la spermatogenèse. La mise en place de la méthylation *de novo* dans les cellules germinales est régulée par l'ADN méthyltransférase Dnmt3A et son cofacteur Dnmt3L [7].

La chronologie de réplication différentielle en phase S des *clusters* de gènes soumis à empreinte pourrait déjà être acquise dans les cellules germinales et pourrait précéder l'acquisition de la méthylation au moins dans les ovocytes [8]. Il est donc possible qu'une chronologie de réplication différentielle conduise à une accessibilité différente de l'ADN à la méthylation *de novo* et à son maintien.

Maintien de l'empreinte

Après la fécondation, il se produit une nouvelle vague de déméthylation étendue à presque l'ensemble du génome qui épargne les ICR par l'action de Dnmt1, l'ADN méthyltransférase de maintenance qui reproduit les profils de méthylation au moment de la réplication. Alors que le génome paternel est largement déméthylé par un mécanisme actif quelques heures seulement après la fécondation quand les génomes parentaux sont encore séparés dans les pronoyaux, le génome maternel est largement déméthylé passivement par impossibilité de maintenir la méthylation pendant la réplication de l'ADN. Cette déméthylation postzygotique est suivie d'une vague de reméthylation après la nidation, qui épargne également les ICR (e-figure 21.4).



e-figure 21.4

Reprogrammation de la méthylation dans la lignée germinale puis chez l'embryon murin.

La figure montre le niveau de méthylation, d'une part des gènes soumis à empreinte méthylés (noir) et non méthylés (trait gris superposé à l'axe du temps) et, d'autre part, des séquences non soumises à empreinte (rouge : maternelles, rose : paternelles), dans les cellules germinales et au cours des premières étapes du développement embryonnaire. Le temps est indiqué en abscisse et le niveau relatif de méthylation est indiqué en ordonnée. Le niveau de méthylation et le temps ne sont pas représentés à l'échelle (E : jours de gestation chez la souris).

Mécanismes de lecture de l'empreinte

La lecture est la conversion des empreintes en une expression différentielle. Cette expression différentielle concerne essentiellement la transcription (bien que des mécanismes post-transcriptionnels puissent également jouer un rôle). Les mécanismes semblent en être complexes. La complexité provient du fait que de nombreux gènes sont groupés en *clusters* et que ces groupements mettent en jeu des interactions entre des gènes voisins et leurs séquences de contrôle. Pour réguler leur expression, les gènes soumis à empreinte utilisent l'arsenal habituel des mécanismes de contrôle transcriptionnel, dont certains sont dépendants des modifications épigénétiques. Les promoteurs des gènes, transcrits antisens, *enhancers* et séquences frontières et *silencers* peuvent réguler l'expression de *clusters* de gènes soumis à empreinte.

Méthylation du promoteur

Dans ce cas, la région promotrice, qui est souvent riche en CpG, est très méthylée sur l'un des allèles (e-figure 21.5A). Notons que l'ICR est souvent distincte du promoteur, mais elle est nécessaire à la méthylation du promoteur. La méthylation du promoteur s'accompagne vraisemblablement d'une conformation fermée de la chromatine dans laquelle les facteurs de transcription ne peuvent accéder au promoteur, inhibant ainsi la transcription de l'allèle méthylé.

Longs ARN non codants antisens

Plus de 15 % des gènes soumis à empreinte connus à ce jour sont associés à des longs ARN non codants (e-figure 21.5B). L'expression monoparentale du transcrit antisens pourrait interférer en *cis* avec la transcription du gène sens en altérant la structure chromatinienne ou la méthylation de l'ADN, en excluant le promoteur ou en agissant par des mécanismes propres à l'ARN comme l'ARN-interférence.

Enhancers et séquences frontières

L'existence d'*enhancers* (séquences d'ADN stimulant en *cis* la transcription de gènes) partagés entre gènes différents suggère l'existence de frontières chromatinienues (e-figure 21.5C). À titre d'exemple, chez la souris, un *enhancer* est partagé par le gène d'expression paternelle *Igf2* et le gène d'expression maternelle *H19*. L'ICR située entre le gène *Igf2* et le gène *H19* contient la méthylation d'empreinte dans

la lignée paternelle conduisant à la répression transcriptionnelle du gène *H19* paternel, mais autorisant l'expression du gène *Igf2* paternel. Cette ICR est une frontière chromatinienne ouverte sur l'allèle paternel, car l'élément frontière CTCF (facteur protéique reconnaissant la séquence frontière CCCTC) ne peut pas se lier à l'allèle paternel méthylé. Cette frontière chromatinienne est fermée par l'élément CTCF sur l'allèle maternel non méthylé, ne permettant pas la transcription du gène *Igf2* maternel [9].

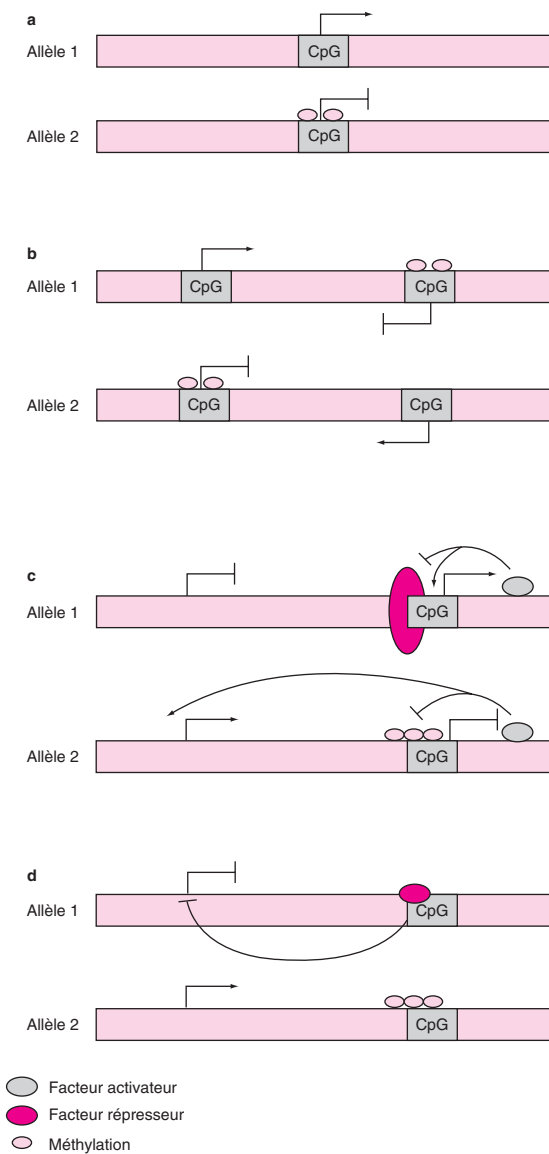
Silencers

Certains gènes soumis à empreinte ont des ICR méthylées sur l'allèle actif. Ces séquences d'ADN contiennent des *silencers* (séquences d'ADN inhibant en *cis* la transcription de gènes par fixation de facteurs répresseurs), inactivés lorsqu'ils sont méthylés (e-figure 21.5D).

Évolution

Les premiers signes d'une empreinte parentale semblent être apparus chez les mammifères, il y a environ 150 millions d'années, chez l'ancêtre commun des thériens (animaux à placenta), après la divergence des monotrèmes (e-figure 21.6). L'émergence de l'empreinte parentale chez les mammifères serait liée à l'apparition du placenta et son amplification à la sophistication de cet organe. Les thériens comprennent d'une part les marsupiaux comme le kangourou et l'opossum et d'autre part les euthériens tels la souris et l'homme. Les marsupiaux, chez qui l'on observe une empreinte moins étendue que chez les euthériens, possèdent un placenta rudimentaire et un développement *in utero* de courte durée. Les monotrèmes (mammifères non thériens ovipares) semblent dépourvus de gènes soumis à empreinte parentale.

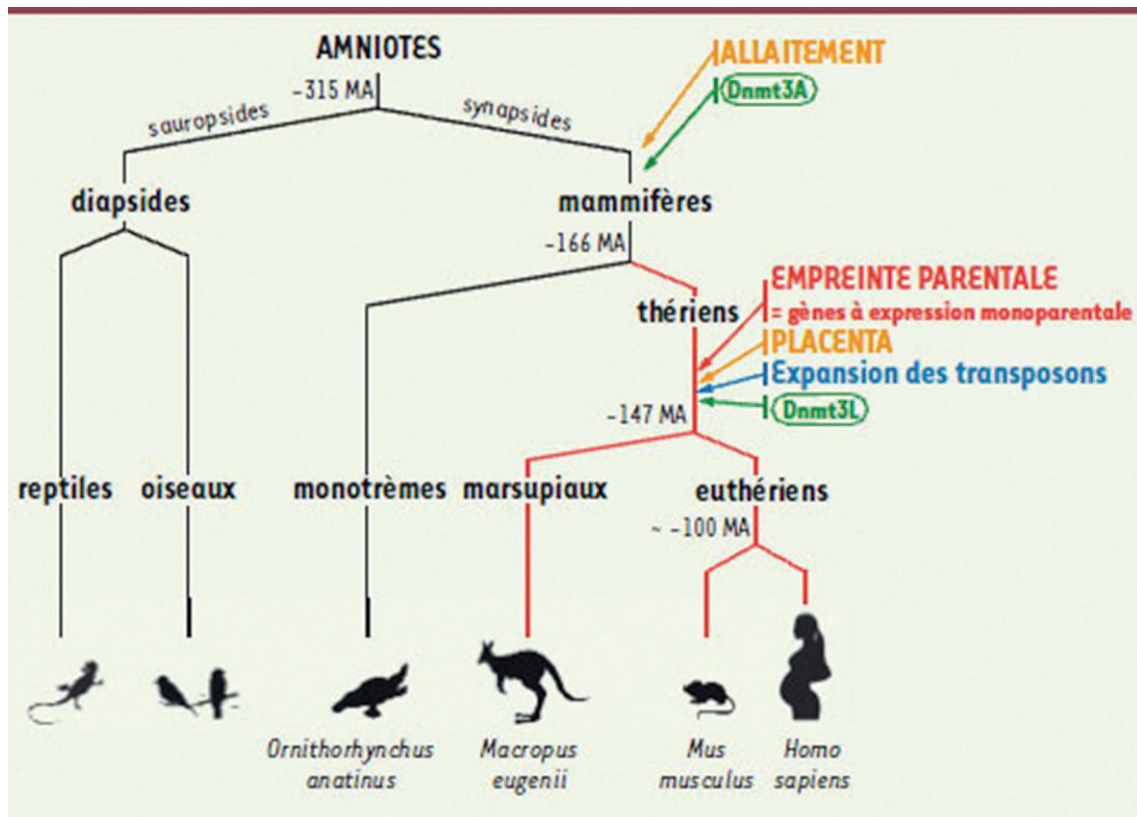
Une proportion importante de gènes soumis à empreinte affecte la croissance fœtale d'une façon potentiellement antagoniste : les gènes d'expression paternelle stimulent la croissance fœtale et les gènes d'expression maternelle répriment la croissance fœtale. Ces observations ont conduit à considérer l'hypothèse d'un « conflit génétique pour les ressources maternelles ». Les gènes d'expression paternelle seraient sélectionnés pour extraire le maximum des ressources de la mère au bénéfice de la descendance, alors que les gènes d'expression maternelle tendraient à conserver ces ressources pour les répartir entre un plus grand nombre de descendants, ce qui optimiserait les performances reproductives de la mère.



e-figure 21.5

Mécanismes de lecture des gènes soumis à empreinte.

a. Répression transcriptionnelle par la méthylation des îlots CpG ou du promoteur. b. Régulation conjointe par des transcrits antisens et par la méthylation des îlots CpG ou du promoteur. c. Régulation spécifique d'allèle de gènes voisins par méthylation différentielle au sein d'un îlot CpG. Sur l'allèle 1, le facteur de liaison à la séquence CCCTC (CTCF, disque rouge) se fixe sur l'allèle non méthylé, ce qui autorise l'expression du gène d'aval et bloque l'accès des séquences enhancers d'aval (gris) aux facteurs promoteurs d'amont, conduisant à une répression transcriptionnelle du gène d'amont. L'absence de fixation du facteur CTCF sur l'allèle 2 méthylé autorise l'expression du gène d'amont, alors que le gène d'aval est réprimé. d. La fixation de facteurs répresseurs (rouge) qui répriment le promoteur en *cis*, est possible sur l'allèle 1 non méthylé.



e-figure 21.6

Apparition de l'imprinte parentale au cours de l'évolution.

Trois groupes de mammifères ont recours à l'allaitement : les monotrèmes, les marsupiaux et les euthériens. Seuls les marsupiaux et des euthériens, qui composent le groupe des thériens, ont un placenta. L'imprinte parentale est apparue avant la divergence des thériens, coïncidant avec l'acquisition du placenta, de Dnmt3L et de l'expansion des transposons. MA : millions d'années.

Source : Charlotte Proudhon, Déborah Bourc'his. Évolution de l'imprinte parentale chez les mammifères. *Quelle ménagerie ! Med Sci* 2010; 26(5) : 497–503.

Si certains gènes soumis à empreinte ont eu une évolution rapide, la rapidité d'évolution des protéines codées par les gènes soumis à empreinte n'est pas supérieure à celle des autres gènes. Les caractéristiques de l'empreinte elle-même semblent soumises à une plus grande variation entre les espèces. Bien que le statut de l'empreinte d'un nombre considérable de gènes soit identique chez la souris et chez l'homme, il existe quelques exceptions importantes. Par exemple, le gène *humain IGF2R* présente une expression dépendante de l'empreinte durant le développement embryonnaire précoce seulement, alors que le gène *murin* a une expression soumise à empreinte stable dans les tissus et au cours du développement embryonnaire. Il est donc possible que la régulation des gènes soumis à empreinte évolue rapidement; ce phénomène pourrait contribuer aux mécanismes de spéciation des mammifères. De telles modifications pourraient porter sur les modifications épigénétiques, mais également sur les séquences de régulation de la lecture de l'empreinte (*enhancers*, séquences frontières ou *silencers*).

Épimutations, clonage et reprogrammation

Épimutations

Tout comme les mutations altèrent l'ADN, les épimutations altèrent la méthylation de l'ADN ou la conformation chromatinienne. Les épimutations touchant les gènes soumis à empreinte peuvent conduire soit à une expression biallélique (relaxation d'empreinte), soit à une absence d'expression. La fréquence de ces épimutations dans la lignée germinale ou durant le développement somatique reste inconnue à ce jour.

Les épimutations observées dans les syndromes génétiques surviennent vraisemblablement dans la lignée germinale et s'accompagnent d'un défaut de l'effacement de l'empreinte grand-parentale ou d'un défaut d'apposition de la nouvelle empreinte. *A contrario*, la méthylation aberrante du gène *H19*, observée dans la tumeur de Wilms isolée, est somatique (accident causal survenu pendant le développement embryonnaire précoce).

Clonage et reprogrammation

Le clonage reproductif de divers mammifères a été effectué récemment par l'utilisation du noyau de cellules différenciées de donneur. Les profils d'expression des gènes, et probablement aussi les caractéristiques épigénétiques, sont vraisemblablement reprogrammés quand les noyaux

des cellules somatiques sont introduits dans les ovocytes énucléés. Le fait que le clonage soit très peu efficace, et que la grande majorité des clones meurent pendant le développement, pourrait indiquer que le procédé de reprogrammation a été, dans ces cas, inefficace.

De plus, les animaux clonés ont fréquemment des défauts très évocateurs d'une dérégulation des gènes soumis à empreinte, hypertrophie placentaire et fœtale puis mort périnatale, ce qui suggère que les cellules somatiques du donneur pourraient avoir des profils d'empreinte aberrants ou que la reprogrammation interférerait avec la maintenance correcte de l'empreinte.

Enfin, l'observation surprenante de la réversibilité par clonage de certains caractères du vieillissement de la cellule conduit à supposer qu'un mécanisme important des processus de vieillissement puisse être l'acquisition somatique de modifications épigénétiques.

Empreinte parentale et pathologies humaines

Parmi les pathologies les mieux caractérisées, secondaires à des anomalies de l'empreinte parentale, citons le syndrome de Prader-Willi et le syndrome d'Angelman (SPW, SA, 15q11-q13), le syndrome de Wiedemann-Beckwith et le syndrome de Silver-Russell (SBW, SRS, 11p15) et certaines tumeurs pédiatriques et de l'adulte.

Syndrome de Prader-Willi et syndrome d'Angelman

Phénotypes

Le SPW et le SA sont des anomalies du développement qui comportent des troubles de la croissance, un déficit cognitif et des troubles du comportement. Le SPW touche un enfant sur 15 000 environ. Les patients qui présentent un SPW ont une hypotonie néonatale majeure et un retard de croissance staturo-pondéral néonatal. Après la première année de la vie, on observe une hyperphagie avec obésité sévère, un hypogonadisme, une petite taille, des extrémités courtes, une déficience intellectuelle modérée et des troubles du comportement (e-figure 21.7A et B).

Le SA concerne un enfant sur 20 000 environ; les patients atteints d'un SA présentent une ataxie, un tremblement, une épilepsie, des troubles du sommeil, un retard moteur et mental sévère avec une absence de langage, une jovialité et des accès de rire immotivés (e-figure 21.7C et D).



e-figure 21.7

Syndromes de Prader-Willi et d'Angelman.

a et b. Syndrome de Prader-Willi : noter l'obésité, la dysmorphie discrète avec des yeux en amande, une petite bouche aux coins tombants, l'hypogénitalisme et les mains courtes et trapues. c et d. Syndrome d'Angelman : noter l'aspect jovial et la grande bouche.

Mécanismes génétiques

Le SPW et le SA sont dus à des anomalies variées de la région 15q11-q13 (e-figure 21.8), qui contient plusieurs gènes soumis à empreinte parentale. Le SPW est dû à l'abolition de l'expression de quelques gènes soumis à empreinte, normalement actifs sur le chromosome 15 d'origine paternelle; le SA est causé par l'abolition de l'expression du gène *UBE3A*, normalement actif sur le chromosome 15 d'origine maternelle.

Grandes délétions chromosomiques

Les anomalies les plus fréquentes sont des grandes délétions de la région chromosomique 15q11-q13, qui intéressent le chromosome d'origine paternelle chez les patients atteints d'un SPW (environ 70 % des cas de SPW) et le chromosome d'origine maternelle dans le SA (environ 70 % des cas de SA).

Disomies uniparentales

Les disomies uniparentales (DUP) maternelles du chromosome 15q11-q13 sont fréquentes (25 % des cas de SPW). Les DUP du chromosome 15q11-q13 d'origine paternelle sont rares (2 % des cas de SA). Ainsi, une contribution biparentale du chromosome 15q11-q13 est requise pour un développement normal et l'origine parentale d'une DUP conditionne le phénotype.

Mutations géniques

Dans le SA, près de 20 % des patients présentent une mutation ponctuelle du gène *UBE3A* d'origine maternelle. En revanche, aucune mutation n'a été observée à ce jour dans le SPW, ce qui suggère que l'absence d'expression de plusieurs gènes pourrait être nécessaire pour conduire au SPW, et/ou que des mutations ponctuelles d'un seul gène de la région correspondante donneraient lieu à des phénotypes non encore reconnus.

Translocations chromosomiques

Dans le SPW, on observe très rarement une translocation apparemment équilibrée de la région 15q11-q13 paternelle; dans ces cas, le mécanisme responsable du SPW pourrait faire intervenir une « disruption » de la structure chromatiniennne.

Mutations des centres de l'empreinte

Environ 5 % des patients atteints d'un SPW ou d'un SA ont hérité un chromosome 15 entier apparemment normal de chacun de leurs parents, mais présentent une anomalie

de la méthylation et de l'expression des gènes soumis à empreinte de la région 15q11-q13. Cette observation suggère que ces patients présentent une mutation qui conduit à une anomalie de l'apposition de l'empreinte elle-même (mutation d'empreinte). En effet, de petites délétions comprenant soit le premier exon du gène *SNRNP* dans le SPW, soit situées en 5' du premier exon de ce gène dans le SA, ont été mises en évidence. Ces microdélétions non chevauchantes définissent les centres de l'empreinte des SPW et SA, respectivement. Dans le SPW, ces délétions sont situées sur le chromosome 15 paternel, alors qu'elles sont situées sur le chromosome 15 maternel dans le SA.

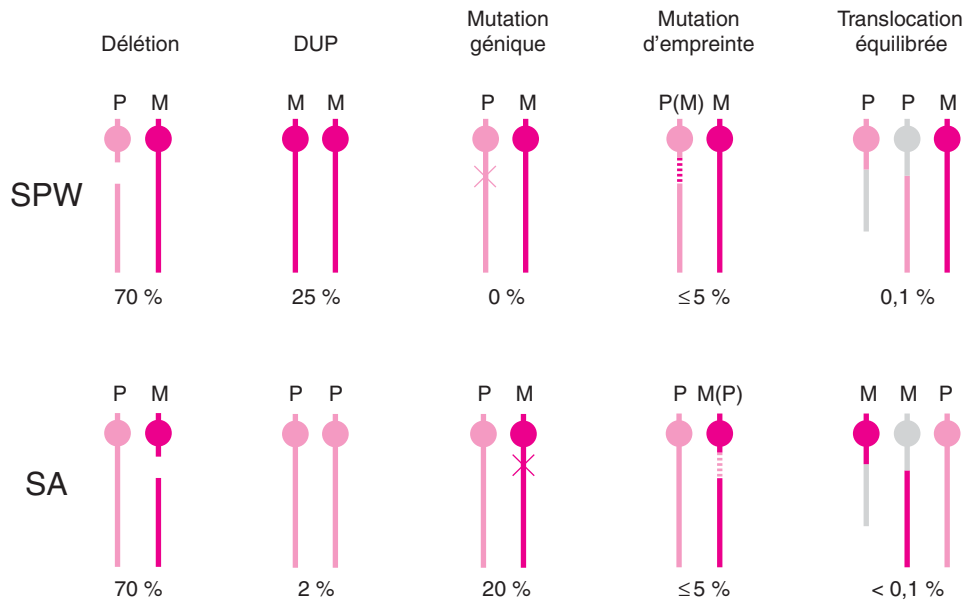
Les délétions de ces centres de l'empreinte bloquent le changement (*switch*) d'épigénotype dans la lignée germinale [10]. Dans la lignée germinale paternelle, le chromosome délété d'origine grand-maternelle ne peut pas être méthylé et reste dans la situation d'un épigénotype maternel malgré le passage par une lignée paternelle, ce qui conduit à un SPW. De façon symétrique, dans la lignée germinale maternelle, le chromosome délété grand-paternel ne peut pas être méthylé et adopte un épigénotype paternel malgré le passage par une lignée maternelle, conduisant à un SA (e-figure 21.9).

Syndrome de Wiedemann-Beckwith et syndrome de Silver-Russell

Le SBW est caractérisé par une avance de croissance et une prédisposition à la survenue de tumeurs embryonnaires pédiatriques. Le SRS comporte un retard de croissance pré- et postnatal. Ces syndromes, qui présentent dans une certaine mesure un phénotype en miroir, sont dus à diverses anomalies génétiques ou épigénétiques qui touchent un *cluster* de gènes soumis à empreinte situé dans une région d'environ 1 mégabase du chromosome 11p15. La région 11p15 est organisée en deux domaines qui sont sous le contrôle de centres de l'empreinte distincts. Le SRS peut aussi être causé par une disomie uniparentale maternelle du chromosome 7 (DUP7mat), dans 10 % des cas. Les gènes *GRB10* (7p11.2-p12) et *MEST* (7q32) pourraient être impliqués dans le retard de croissance observé dans la DUP7mat [11].

Phénotypes

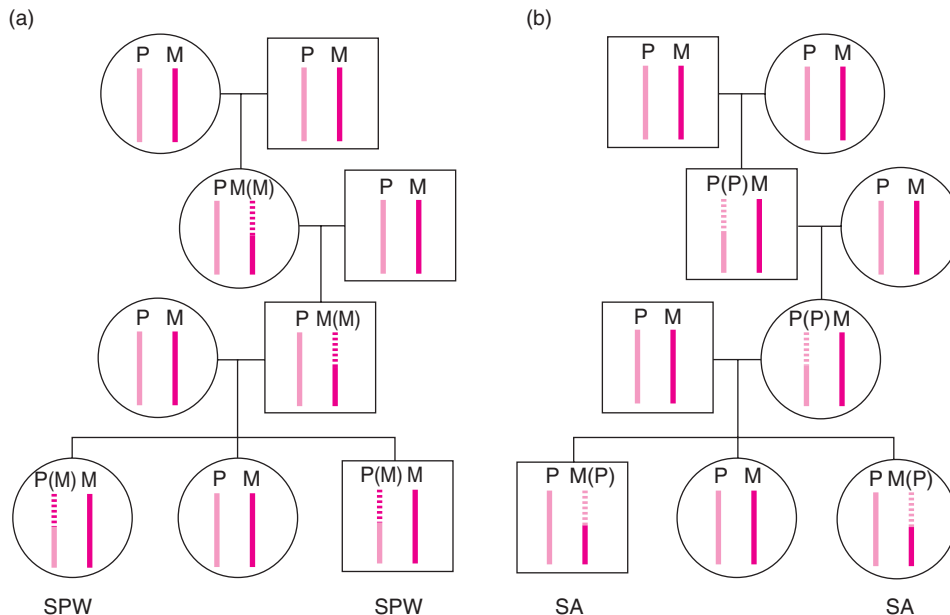
Le SBW ($\approx 1/15\,000$ naissances) est caractérisé par une avance de croissance pré- et postnatale, une macroglossie et des anomalies de fermeture de la paroi abdominale antérieure. De plus, on observe parfois une organomégalie,



e-figure 21.8

Mécanismes moléculaires responsables du syndrome de Prader-Willi et du syndrome d'Angelman.

Les délétions et les mutations d'empreinte ont une fréquence voisine dans le SPW et dans le SA, alors que la DUP est plus fréquente dans le SPW que dans le SA, en raison du taux plus élevé de non-disjonctions maternelles. Il n'a pas été observé de mutations ponctuelles dans le SPW. M, maternel (rouge); M(P), mutation du centre de l'empreinte conduisant à un épigénotype paternel fixé (absence de switch de l'empreinte, lignes roses horizontales) après passage par la lignée maternelle; P(M), mutation du centre de l'empreinte conduisant à un épigénotype maternel fixé (lignes rouges horizontales) après passage dans la lignée paternelle; DUP, disomie uniparentale. Le chromosome distinct du chromosome 15, impliqué dans de rares translocations équilibrées, est indiqué en vert.



e-figure 21.9

Transmission des mutations d'empreinte : anomalie du switch de l'empreinte dans la lignée germinale parentale.

L'empreinte parentale (épigénotype) sur le chromosome 15 dans les cellules somatiques est indiquée dans les cercles (filles) et les carrés (garçons). a. SPW : si une mutation survient dans la lignée germinale d'un ascendant féminin, elle fixe alors l'épigénotype féminin sur le chromosome (M[M]). La transmission par une mère de l'épigénotype féminin à la génération suivante conduit à un phénotype normal. Cependant, dans la lignée germinale d'un garçon, la mutation bloque l'effacement de l'empreinte maternelle, conduisant à la transmission d'un chromosome paternel avec une empreinte maternelle (P[M]). Par conséquent, 50 % des enfants auront deux chromosomes avec une empreinte maternelle et présenteront un SPW. b. SA : l'empreinte paternelle fixée sur le chromosome d'un ancêtre masculin (P[P]) est transmise sans conséquence pathologique d'un père à son fils, mais dans la lignée germinale d'une fille, la mutation bloque le switch de l'épigénotype paternel. Celle-ci transmettra donc dans 50 % des cas un chromosome maternel ayant un épigénotype paternel (M[P]), conduisant à un SA.

des épisodes d'hypoglycémie, une hémihypertrophie, des anomalies génito-urinaires et, chez près de 5 % des enfants, des tumeurs embryonnaires représentées le plus souvent par un néphroblastome (ou tumeur de Wilms). Les cas sporadiques sont les plus fréquents, mais des formes familiales autosomiques dominantes existent (environ 15 % des cas). Le SRS ($\approx 1/100\,000$ naissances) est cliniquement et génétiquement hétérogène. Ce syndrome est caractérisé par une hypotrophie, un retard de croissance intra-utérin et postnatal, un visage triangulaire, un périmètre crânien conservé et une hémihypotrophie. Les cas sporadiques sont la règle mais de rares formes familiales monogéniques ont été décrites, imposant un conseil génétique prudent. Une augmentation du risque de survenue de ce syndrome a été observée chez les enfants nés par assistance médicale à la procréation (AMP).

Gènes situés dans la région 11p15

Les gènes de la région 11p15 soumis à empreinte sont organisés en deux domaines (e-figure 21.10). Le domaine 1 contient les gènes soumis à empreinte *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) et *H19*, et une région méthylée de façon différentielle (ICR1). Le gène *H19*, exprimé sur l'allèle maternel, est transcrit en un ARN non traduit et le gène *IGF2* code un facteur de croissance exprimé sur l'allèle paternel. Une augmentation de l'expression du gène *IGF2* (expression en double dose) peut être observée en cas de duplication du chromosome 11p15 paternel, de disomie uniparentale paternelle du chromosome 11p15 et d'hyperméthylation de l'ICR1 maternelle. Inversement, une diminution de l'expression du gène *IGF2* peut être observée en cas d'hypométhylation de l'ICR1 paternelle.

Le domaine 2 comprend six gènes soumis à empreinte, dont le gène *CDKN1C*, exprimé sur l'allèle maternel, qui code une protéine qui régule négativement la prolifération cellulaire. *TSSC3* (*IPL*), *SLC22A1L* (*IMPT1*) et *KCNQ1* sont également exprimés sur l'allèle maternel. Le gène *KCNQ1* code une protéine qui forme un canal potassium. L'intron10 du gène *KCNQ1* contient une région méthylée différenciellement (ICR2). L'ICR2 paternelle n'est pas méthylée, ce qui permet l'expression paternelle du transcrit antisens *KCNQ1OT1*, qui réprime *KCNQ1* en *cis*. La méthylation maternelle de l'ICR2 bloque l'expression de *KCNQ1OT1* et permet l'expression des gènes *KCNQ1* et *CDKN1C* en *cis*.

Mécanismes génétiques

Si les cas de SBW trouvent aujourd'hui une explication, aucune cause n'est identifiée à ce jour chez près de la moitié des enfants atteints de SRS.

Anomalies de l'empreinte de la région 11p15

L'anomalie épigénétique la plus fréquemment mise en évidence dans le SBW (50 % des cas de SBW) est la perte de la méthylation maternelle de l'ICR2, associée à la perte de l'empreinte maternelle du gène *KCNQ1OT1*. Dans près de la moitié de ces derniers cas, on observe également des anomalies de méthylation à de multiples loci du génome.

Une hyperméthylation de l'ICR1 maternelle est retrouvée dans plus de 10 % des cas de SBW et conduit à l'expression de l'allèle maternel du gène *IGF2* normalement silencieux (expression en double dose d'*IGF2*). De façon opposée, une hypométhylation de l'ICR1 paternelle est observée dans 40 % des cas de SRS et conduit à l'absence d'expression du gène *IGF2* paternel normalement actif.

Dans moins de 1 % des cas de SBW, on peut identifier des microdélétions de l'ICR1 ou de l'ICR2.

Mutations géniques

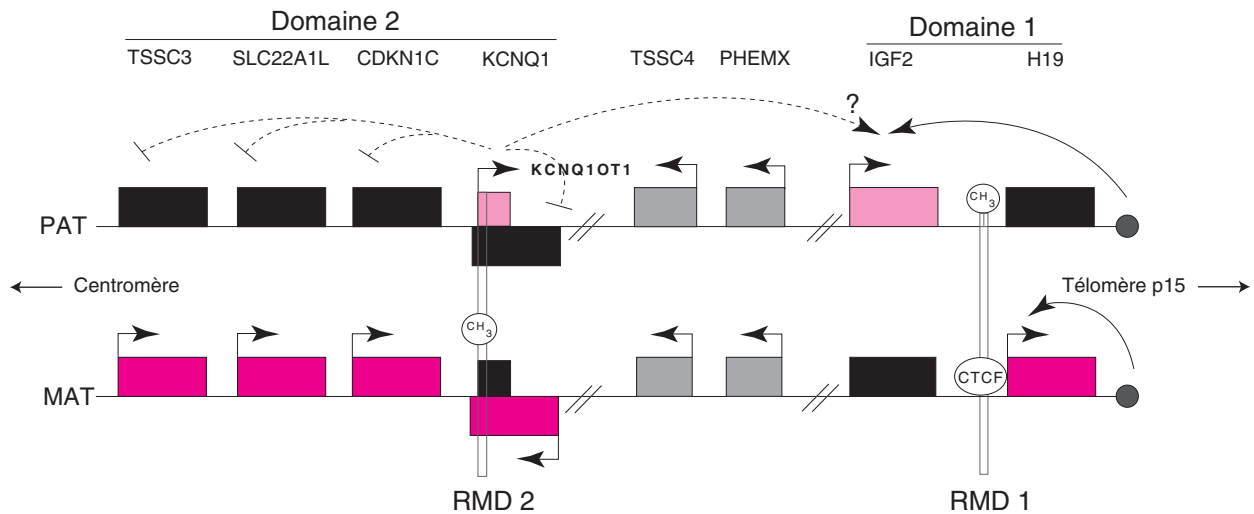
Dans les formes familiales de SBW, le risque pour les descendants dépend du sexe du parent transmetteur. Des mutations germinales du gène *CDKN1C* ont été identifiées chez des patients présentant un SBW familial (40 % des cas familiaux) ou sporadique (5 % des cas sporadiques). Ces mutations pourraient conduire à une perte de l'inhibition du cycle cellulaire. Le gène *CDKN1C* est exprimé sur l'allèle d'origine maternelle, ce qui concorde avec le fait que seules les mutations de ce gène transmises par la mère conduisent à un SBW.

Disomies uniparentales partielles

Dans environ 20 % des cas sporadiques de SBW, on met en évidence une isodisomie uniparentale (DUP) paternelle de la région 11p15, toujours en mosaïque, qui résulte d'une recombinaison postzygotique.

Remaniements chromosomiques

Des remaniements chromosomiques autres que les microdélétions sont observés dans 2 % des cas de SBW ; il s'agit de duplications, inversions ou translocations touchant la région distale du chromosome 11p. Les duplications touchent toujours le chromosome d'origine paternelle et les translocations et inversions concernent invariablement le chromosome d'origine maternelle. Des anomalies chromosomiques variées (chromosomes 7, 11, 15 et 17) ont été identifiées chez 1–2 % des enfants avec un SRS.



e-figure 21.10

Cluster de gènes soumis à empreinte parentale sur le chromosome 11p15.

Les gènes d'expression maternelle sont indiqués en rouge et les gènes d'expression paternelle sont représentés en rose. Les gènes dessinés en gris ne sont pas soumis à empreinte. Le sens de transcription des gènes est indiqué par des flèches. Les hachures symbolisent des régions non représentées. La méthylation des ICR 1 et 2 est indiquée par un cercle contenant un groupe méthyl (CH₃).

Pathologie tumorale

Les gènes soumis à empreinte étant fonctionnellement haploïdes, un gène suppresseur de tumeur soumis à empreinte (c'est-à-dire dont un seul allèle est physiologiquement actif) peut conduire à un risque élevé de cancer car l'inactivation de ce seul allèle suffit à entraîner la perte de la fonction suppresseur de tumeur. En effet, des anomalies de l'empreinte parentale touchant des régions contenant des gènes suppresseurs de tumeurs ont été impliquées dans le développement de cancers : le neuroblastome (délétion de la région chromosomique 1p36 d'origine maternelle ou du chromosome 2 d'origine paternelle), la leucémie aiguë myéloblastique (chromosome 7 paternel), le néphroblastome ou tumeur de Wilms (chromosome 11p15 maternel), l'ostéosarcome (chromosome 13 maternel), les tumeurs du glomus (régions chromosomiques 11q13 et 11q22.3-q23.3 paternelles).

La dérégulation de protéines jouant un rôle dans le cycle cellulaire et de facteurs de croissance est fortement associée au risque de survenue de tumeurs embryonnaires dans le SBW. En effet, les enfants qui présentent un néphroblastome ont le plus souvent des altérations épigénétiques du domaine 1 de la région 11p15. Dans le cas des rhabdomyosarcomes et des hépatoblastomes, des anomalies épigénétiques du domaine 2 de la région 11p15 ont été identifiées.

Fonctions des gènes soumis à empreinte parentale

Les anomalies qui touchent des régions ou des gènes soumis à empreinte parentale peuvent conduire à des syndromes génétiques qui constituent alors des paradigmes pour comprendre le rôle des gènes soumis à empreinte parentale. Des études des profils de méthylation de gènes ciblés contribuent également à ces connaissances en évolution rapide. Les gènes soumis à empreinte parentale jouent un rôle dans la viabilité et la croissance pré- et postnatale, le métabolisme (thermogenèse, adiposité), le comportement (succion et alimentation en période néonatale, comportement maternel vis-à-vis de sa descendance, sommeil, comportement sexuel, émotions), la cognition (maintenance et renouvellement des cellules-souches dans le cerveau adulte) [12] et la survenue de certaines tumeurs.

Perspectives

Il est intéressant de considérer l'empreinte génomique parentale chez les mammifères à partir de plusieurs points de vue, incluant les mécanismes de son apposi-

tion et sa signification en termes d'évolution. De plus, les conséquences phénotypiques des gènes soumis à empreinte parentale sont plus étendues qu'on ne l'avait initialement supposé. Ainsi, au-delà des effets avant la naissance, les gènes soumis à empreinte ont d'importants effets métaboliques, neurologiques et sur le comportement tout au long de la vie, incluant par exemple la régulation de la température corporelle et les interactions mère-enfant. Ces gènes peuvent être impliqués dans la survenue de pathologies communes comme l'obésité, le diabète ou certaines tumeurs et leur connaissance pourraient ouvrir des perspectives thérapeutiques. L'utilisation du séquençage haut débit devrait permettre d'identifier l'ensemble des gènes soumis à empreinte parentale et faciliter l'étude de leur spécificité spatiotemporelle tant chez l'animal que chez l'homme.

Références

- [1] Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; 308(5959) : 548–50.
- [2] McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the material and paternal genomes. *Cell* 1984; 37(1) : 179–83.
- [3] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366(6453) : 362–5.
- [4] Xie W, Barr CL, Kim A, et al. Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell* 2012; 148(4) : 816–31.
- [5] Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 2005; 15(6) : 875–84.
- [6] Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, et al. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* 1993; 364(6436) : 459–63.
- [7] Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004; 429(6994) : 900–3.
- [8] Simon I, Tenzen T, Reubinoff BE, et al. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* 1999; 401(6756) : 929–32.
- [9] Schoenherr CJ, LeVorse JM, Tilghman SM. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet* 2003; 33(1) : 66–9.
- [10] Buiting K, Saitoh S, Gross S, et al. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting center on human-chromosome 15. *Nat Genet* 1995; 9(4) : 395–400.
- [11] Monk D, Bentley L, Hitchens M, et al. Chromosome 7p disruptions in Silver Russell syndrome : delineating an imprinted candidate gene region. *Hum Genet* 2002; 111(4-5) : 376–87.
- [12] Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease : an expanding view. *Nat Rev Genet* 2014; 15(8) : 517–30.

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte.com/complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 21.1

Complémentarité fonctionnelle des génomes parentaux.

Les zygotes de départ sont obtenus à partir d'un croisement de deux lignées murines différentes, l'une représentée en rouge, l'autre en blanc. L'échange du pronoyau femelle d'un œuf fécondé avec le pronoyau mâle d'un autre œuf fécondé permet d'obtenir des embryons diploïdes uniparentaux paternels (embryon androgénote, 1) et maternels (embryon gynogénote, 2). En revanche, si l'on échange entre eux les deux pronoyaux paternels, les embryons ainsi obtenus conservent un génome biparental (3) et (4). Seuls les embryons possédant un génome biparental donnent des nouveau-nés viables.



e-figure 21.4

Reprogrammation de la méthylation dans la lignée germinale puis chez l'embryon murin.

La figure montre le niveau de méthylation, d'une part des gènes soumis à empreinte méthylés (noir) et non méthylés (gris) et, d'autre part, des séquences non soumises à empreinte (rouge : maternelles, rose : paternelles), dans les cellules germinales et au cours des premières étapes du développement embryonnaire. Le temps est indiqué en abscisse et le niveau relatif de méthylation est indiqué en ordonnée. Le niveau de méthylation et le temps ne sont pas représentés à l'échelle (E : jours de gestation chez la souris).



e-figure 21.5

Mécanismes de lecture des gènes soumis à empreinte.

a. Répression transcriptionnelle par la méthylation des îlots CpG ou du promoteur. b. Régulation conjointe par des transcrits antisens et par la méthylation des îlots CpG ou du promoteur. c. Régulation spécifique d'allèle de gènes voisins par méthylation différentielle au sein d'un îlot CpG. Sur l'allèle 1, le facteur de liaison à la séquence CCCTC (CTCF, disque rouge) se fixe sur l'allèle non méthylé, ce qui autorise l'expression du gène d'aval et bloque l'accès des séquences enhancers d'aval (gris) aux facteurs promoteurs d'amont, conduisant à une répression transcriptionnelle du gène d'amont. L'absence de fixation du facteur CTCF sur l'allèle 2 méthylé autorise l'expression du gène d'amont, alors que le gène d'aval est réprimé. d. La fixation de facteurs répresseurs (rouge) qui répriment le promoteur en *cis*, est possible sur l'allèle 1 non méthylé.



e-figure 21.6

Apparition de l'empreinte parentale au cours de l'évolution.

Trois groupes de mammifères ont recours à l'allaitement : les monotrèmes, les marsupiaux et les euthériens. Seuls les marsupiaux et des euthériens, qui composent le groupe des thériens, ont un placenta. L'empreinte parentale est apparue avant la divergence des thériens, coïncidant avec l'acquisition du placenta, de Dnmt3L et de l'expansion des transposons. MA : millions d'années.



Source : Charlotte Proudhon, Deborah Bourc'his. Évolution de l'empreinte parentale chez les mammifères. *Quelle ménagerie ! Med Sci* 2010; 26(5) : 497–503.

e-figure 21.7

Syndromes de Prader-Willi et d'Angelman.

a et b. Syndrome de Prader-Willi : noter l'obésité, la dysmorphie discrète avec des yeux en amande, une petite bouche aux coins tombants, l'hypogénitalisme et les mains courtes et trapues. c et d. Syndrome d'Angelman : noter l'aspect jovial et la grande bouche.



e-figure 21.8**Mécanismes moléculaires responsables du syndrome de Prader-Willi et du syndrome d'Angelman.**

Les délétions et les mutations d'imprinte ont une fréquence voisine dans le SPW et dans le SA, alors que la DUP est plus fréquente dans le SPW que dans le SA, en raison du taux plus élevé de non-disjonctions maternelles. Il n'a pas été observé de mutations ponctuelles dans le SPW.

M, maternel (rouge); M(P), mutation du centre de l'imprinte conduisant à un épigénotype paternel fixé (absence de switch de l'imprinte, lignes roses horizontales) après passage par la lignée maternelle; P, paternel (rose); P(M), mutation du centre de l'imprinte conduisant à un épigénotype maternel fixé (lignes rouges horizontales) après passage dans la lignée paternelle; DUP, disomie uniparentale. Le chromosome distinct du chromosome 15, impliqué dans de rares translocations équilibrées, est indiqué en vert.

**e-figure 21.9****Transmission des mutations d'imprinte : anomalie du switch de l'imprinte dans la lignée germinale parentale.**

L'imprinte parentale (épigénotype) sur le chromosome 15 dans les cellules somatiques est indiquée dans les cercles (filles) et les carrés (garçons). a. SPW : si une mutation survient dans la lignée germinale d'un ascendant féminin, elle fixe alors l'épigénotype féminin sur le chromosome (M[M]). La transmission par une mère de l'épigénotype féminin à la génération suivante conduit à un phénotype normal. Cependant, dans la lignée germinale d'un garçon, la mutation bloque l'effacement de l'imprinte maternelle, conduisant à la transmission d'un chromosome paternel avec une empreinte maternelle (P[M]). Par conséquent, 50 % des enfants auront deux chromosomes avec une empreinte maternelle et présenteront un SPW. b. SA : l'imprinte paternelle fixée sur le chromosome d'un ancêtre masculin (P[P]) est transmise sans conséquence pathologique d'un père à son fils, mais dans la lignée germinale d'une fille, la mutation bloque le *switch* de l'épigénotype paternel. Celle-ci transmettra donc dans 50 % des cas un chromosome maternel ayant un épigénotype paternel (M[P]), conduisant à un SA.

**e-figure 21.10****Cluster de gènes soumis à empreinte parentale sur le chromosome 11p15.**

Les gènes d'expression maternelle sont indiqués en rouge et les gènes d'expression paternelle sont représentés en rose. Les gènes dessinés en gris ne sont pas soumis à empreinte. Le sens de transcription des gènes est indiqué par des flèches. Les hachures symbolisent des régions non représentées. La méthylation des ICR 1 et 2 est indiquée par un cercle contenant un groupe méthyl (CH3).



This page intentionally left blank

Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques

Valérie Biancalana, Jean-Louis Mandel

PLAN DU CHAPITRE

Les mutations dynamiques : généralités	234
Syndrome de l'X Fragile (FXS), syndrome tremblement-ataxie associé à l'X fragile (<i>fragile X-associated tremor ataxia syndrome</i> [FXTAS]), insuffisance ovarienne primaire associée à l'X fragile (<i>fragile X-associated primary ovarian insufficiency</i> [FXPOI])	236
L'ataxie de Friedreich	238
Maladies à expansion de polyglutamine	238
Myotonies dystrophiques DM1 et DM2	240
Une expansion instable d'une répétition hexanucléotide (GGGGCC), cause génétique la plus fréquente de forme familiale de sclérose latérale amyotrophique et de démence frontotemporale	241



Prérequis

Transcription, traduction, modes de transmission, mutation, gain et perte de fonction (voir chapitres 1, «L'architecture du génome», 3, «Structure et fonction du génome humain», 4, «Hérédité monogénique et mosaïcisme» et 9, «Anomalies génétiques à l'échelle du gène»).



L'essentiel à retenir

- Fréquence et sévérité des pathologies concernées, possibilité de diagnostic prénatal en l'absence de thérapie.
- Pratiquement pas de mutation *de novo* (au sens de passage en une génération d'un allèle normal à un allèle clairement pathogénique) : risque de récurrence important et intérêt du conseil génétique.
- Anticipation, biais parental de transmission.
- Instabilité, seuil d'instabilité, seuil de pathogénicité, prémutation et mutation complète.
- Localisation génique, effet (perte de fonction du gène, gain de propriété toxique au niveau protéine ou ARN).

Les mutations dynamiques : généralités

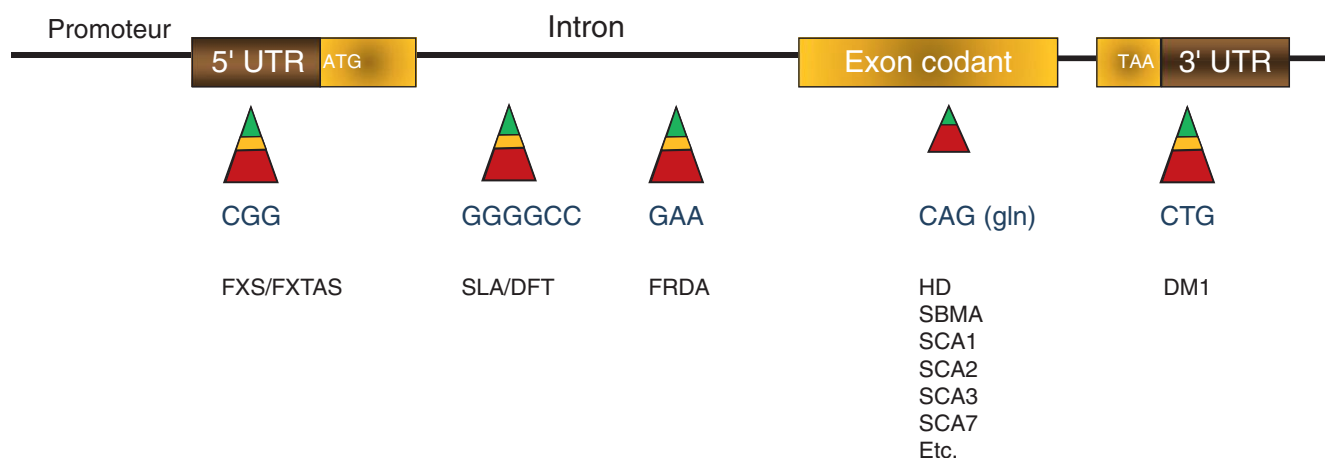
Le génome comporte de nombreuses régions répétées, dont des répétitions portant sur des motifs de quelques nucléotides, appelées *short tandem repeat* (STR) ou microsatellites (voir chapitres 1, «L'architecture du génome», et 3, «Structure et fonction du génome humain»), qui sont observées avec un nombre de répétitions variable à un locus donné dans la population normale. Ce polymorphisme résulte de très rares erreurs de réplication pouvant conduire à un changement mineur du nombre de répétitions à un locus donné et donc à l'apparition de plusieurs allèles. La très grande majorité des STR n'ont aucune conséquence pathologique; cependant, une trentaine a été identifiée comme impliquées dans des maladies génétiques, en général neurologiques ou neuromusculaires. Neuf maladies sont dues à des allongements de répétitions codant pour des motifs polyalanines, qui sont transmis de manière stable dans les familles concernées (figure 22.1), et qui ne sont pas traitées dans ce chapitre (il s'agit notamment de la dystrophie musculaire oculopharyngée et de mutations récurrentes dans

le gène ARX, responsables de déficience intellectuelle avec ou sans épilepsie). Dans le cas des maladies traitées dans ce chapitre, les mutations sont des expansions de STR caractérisées par une instabilité majeure et quasi systématique lors de la transmission parent-enfant, avec souvent une tendance à l'augmentation du nombre de répétitions au cours des générations successives. Ce type de mutation, découvert à partir de 1991, a été qualifié de «mutation dynamique» ou «mutation par expansion instable». Les signes cliniques apparaissent au-delà d'un seuil dit «de pathogénicité». La liste des maladies les plus importantes (par leur fréquence et leur sévérité) impliquant de telles mutations est dressée dans le [tableau 22.1](#). Elles comprennent des maladies autosomiques dominantes (la maladie de Huntington et plusieurs formes d'ataxie spinocérébelleuse, la myotonie dystrophique ou maladie de Steinert, la forme génétique la plus fréquente de sclérose latérale amyotrophie/maladie de Charcot et de démence frontotemporale), autosomique récessive (l'ataxie de Friedreich) ou liée au chromosome X (le syndrome de retard mental avec X fragile et le syndrome FXTAS). L'instabilité des mutations dynamiques entraîne pour plusieurs de ces maladies des anomalies de transmission et notamment le phénomène d'anticipation. Ce terme utilisé, au départ pour la myotonie dystrophique de type 1 (symbole DM1), exprime la notion d'aggravation de génération en génération, la maladie apparaissant plus tôt chez l'enfant atteint que chez le parent transmetteur. Dans le cas du syndrome de l'X fragile, c'est le risque d'avoir un enfant atteint qui paraît augmenter au cours des générations successives. On observe pour plusieurs de ces maladies un biais parental de transmission vers les formes les plus sévères qui est lié au fait que les instabilités majeures, conduisant à une augmentation notable du nombre de répétitions, sont observées préférentiellement selon les cas soit dans la spermatogénèse ou bien dans l'ovogénèse. Ainsi, la forme congénitale très sévère de myotonie dystrophique de type 1 (DM1, maladie de Steinert) est toujours transmise par la mère alors que la forme juvénile de la maladie de Huntington est de transmission paternelle.

Les mécanismes pathologiques liés aux mutations dynamiques sont très divers et peuvent résulter d'une perte de fonction du gène ou d'un gain de propriété toxique (appelé aussi «gain de fonction») au niveau protéique ou au niveau de l'ARN.

La localisation et la nature des mutations dans des gènes connus sont schématisées sur la [e-figure 22.1](#). Nous développerons quelques exemples qui illustrent les maladies les plus fréquentes et importantes à connaître pour un médecin.





e-figure 22.1

Quelques exemples de mutations par expansion instable.

Le codon d'initiation de la traduction (ATG) et un des trois codons de terminaison (TAA) sont représentés au début et à la fin de la région codante pour une protéine. Pour dix pathologies, la répétition en cause est précisée et sa position sur le gène est signalée par un triangle. Dans ces triangles sont symbolisés les groupes des allèles normaux (en vert) ; des allèles au-delà du seuil d'instabilité (en orange) et des allèles au-delà du seuil de pathogénicité (en rouge). Des expansions plus petites de répétitions exoniques du motif GCG codant pour des répétitions polyaniline sont associées à neuf maladies monogéniques, dont une forme de déficience intellectuelle avec ou sans épilepsie (gène *ARX*), la dystrophie musculaire oculopharyngée, ou le syndrome dit « d'Ondine » d'hypoventilation centrale, liée au gène *PHOX2B*). Les expansions polyanilines sont transmises de manière stable.

Tableau 22.1. Principales pathologies liées à des expansions instables (localisation génique et nature des répétitions : figure 22.1).

Maladie	Gène	Mode de transmission	Taille allèles normaux	Taille allèles mutés	Biais de transmission des formes sévères et/ou précoces	Mécanisme pathologique
Maladie de Huntington	<i>HTT</i>	AD	5–35	37–120	Paternel (anticipation et forme juvénile)	Toxicité protéine
Ataxie spinocérébelleuse 1	<i>SCA1</i>	AD	19–38	40–81	Paternel (anticipation)	Toxicité protéine
Ataxie spinocérébelleuse 2	<i>SCA2</i>	AD	15–29	35–59	Peu de biais	Toxicité protéine
Ataxie spinocérébelleuse 3 (maladie de Machado-Joseph)	<i>SCA3/MJD1</i>	AD	14–40	68–82	Instabilité peu marquée	Toxicité protéine
Ataxie spinocérébelleuse 7	<i>SCA7</i>	AD	7–17	38–130	Paternel (anticipation, forme juvénile)	Toxicité protéine
Atrophie musculaire spinobulbaire (SBMA)	AR	XL récessif	11–33	38–66	Instabilité peu marquée	Toxicité protéine (atteinte musculaire) et perte partielle fonction (gynécomastie)
Syndrome de l'X fragile (FXS)	<i>FMR1</i>	XL dominant (pénétrance et expression atténuée chez les femmes)	6–54	200 → 1 000 + méthylation anormale	Maternel (passage de la prémutation à mutation complète)	Perte de fonction
Syndrome tremblement-ataxie associé à l'X fragile (FXTAS)	<i>FMR1</i>	XL dominant (pénétrance et expression atténuée chez les femmes)	6–54	60–200	Pas de biais	Toxicité ARN
Ataxie de Friedreich (FRDA)	<i>FRDA1</i>	AR	6–34	200–1 700	Transmission biparentale	Perte de fonction (partielle)
Dystrophie myotonique type 1 (DM1)	<i>DMPK</i>	AD	5–35	50–4 000	Maternel (forme congénitale)	Toxicité ARN
SLA et/ou DFT liées à <i>c9orf72</i>	<i>c9orf72</i>	AD	2–25	(60)100–4 000	Pas de biais	Toxicité ARN ? Protéines toxiques DPR traduites de la répétition ?

D'autres types de mutation sont également possibles dans les gènes *FMR1* et *FRDA*, responsables de maladies avec perte de fonction. AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif ; XL : lié à l'X.

Syndrome de l'X Fragile (FXS), syndrome tremblement-ataxie associé à l'X fragile (*fragile X-associated tremor ataxia syndrome* [FXTAS]), insuffisance ovarienne primaire associée à l'X fragile (*fragile X-associated primary ovarian insufficiency* [FXPOI], voir chapitre 29, « Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie d'instabilité : le syndrome de l'X fragile »)

Clinique, génétique et mécanisme pathologique

Syndrome de l'X fragile (FXS)

C'est en 1991 que le mécanisme de mutation dynamique a été découvert par la mise en évidence de l'expansion d'une répétition de trinuécléotide dans le gène *FMR1* comme la cause du syndrome de l'X fragile (FXS). C'est la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle familiale; le gène est situé en Xq28 et FXS a une prévalence d'environ 1 garçon sur 5 000 et une fille sur 8 000.

Les garçons atteints présentent en général une déficience intellectuelle modérée à sévère ($QI < 50$). Des caractéristiques physiques du visage peuvent être associées telles que des oreilles grandes et mal ourlées, un visage allongé et une macrocéphalie. Des troubles du comportement incluant une hyperactivité, une anxiété, une hypersensibilité à des stimuli sonores et des manifestations d'agressivité sont fréquents, ainsi que des troubles du sommeil. FXS représente la cause monogénique la plus fréquente d'autisme, avec environ 30 % des garçons FXS qui présentent des signes autistiques, notamment l'évitement du regard, même en situation d'interaction volontaire.

Mais ces signes ne sont ni spécifiques, ni constants et parfois la déficience intellectuelle est le seul signe d'appel, notamment chez les jeunes enfants. Un macroorchidisme est observé chez environ 90 % des garçons après la puberté. Environ 60 % des femmes porteuses de la mutation responsable (mutation complète) sont atteintes de déficience

intellectuelle. Elles présentent en général un phénotype moins sévère, avec des difficultés d'apprentissage, une timidité et une anxiété sociale étant les troubles du comportement les plus fréquents.

Le gène *FMR1* présente une répétition (CGG) dans le premier exon transcrit mais non traduit du gène (région 5'-UTR). La mutation dite complète (MC), qui correspond à un nombre de répétitions (CGG) supérieur à 200, est accompagnée d'une méthylation anormale de la région promotrice du gène, abolissant ainsi la transcription. Il n'y a donc pas ou très peu de synthèse d'ARN messager, ni de protéine : c'est une mutation qui entraîne une perte de fonction du gène *FMR1*, et la protéine correspondante, FMRP, est absente ou présente en quantité très réduite. Quelques autres rares mutations perte de fonction ont été décrites dans le gène tel que des délétions touchant plusieurs exons ou le gène entier, ou des mutations ponctuelles. La protéine FMRP qui lie des ARN messagers et qui se retrouve dans la cellule associée aux polyribosomes joue un rôle, dans les neurones, dans le transport dendritique et la régulation fine de la traduction de certains ARN messagers, au niveau post-synaptique. Son absence semble altérer des mécanismes de plasticité synaptique, impliqués notamment dans la mémoire et l'apprentissage.

La répétition (CGG) du gène *FMR1* est donc responsable du FXS à partir de 200 répétitions, mais le seuil d'instabilité se situe à environ 55 répétitions. Entre les grands allèles normaux et la mutation, les allèles comptant 55 à 200 répétitions constituent les prémutations. Un allèle prémuté est instable lors de sa transmission avec une tendance à l'augmentation du nombre de répétitions au cours des générations par transmission maternelle essentiellement. Lorsqu'une prémutation est transmise par une femme, et par une femme seulement, elle peut être sujette à une instabilité très importante avec une « transition » de prémutation à mutation complète. La probabilité de transition est liée au nombre de répétitions de l'allèle maternel; elle augmente graduellement avec la taille de la prémutation et devient ~100 % à partir de 90 répétitions CGG. Ces particularités de transmission expliquent le phénomène dit d'anticipation dans le FXS, qui traduit l'observation que le risque d'avoir un enfant atteint augmente de génération en génération dans les familles.

Syndrome tremblement-ataxie et insuffisance ovarienne primaire associés à l'X fragile

La prémutation, qui compte de 55 à 200 répétitions CGG, n'est pas associée à une méthylation anormale et est observée dans les familles chez des sujets qui ne sont pas atteints de FXS. C'est seulement des années après la découverte du

gène qu'un lien a été établi entre la prémutation et deux autres manifestations cliniques de pénétrance incomplète : une insuffisance ovarienne primaire (FXPOI) et un syndrome neurodégénératif de l'adulte après 50 ans (FXTAS).

FXPOI est caractérisée par un large spectre de dysfonctionnement ovarien : un taux élevé d'hormone folliculo-stimulante (FSH) et des cycles menstruels erratiques. En moyenne, les femmes porteuses d'une prémutation présentent une ménopause (arrêt total et définitif des cycles menstruels) 5 ans plus tôt que les femmes de la population générale et 20 % d'entre elles présentent une ménopause prématurée (avant l'âge de 40 ans) contre 1 % dans la population générale.

FXTAS est une atteinte neurodégénérative qui survient avec une pénétrance qui augmente avec l'âge mais qui ne se déclare pas avant 50 ans. Elle atteint les hommes porteurs de prémutation (50 % de risque avant l'âge de 75 ans) et environ 8 % des femmes porteuses de prémutation au cours de leur vie. FXTAS est défini par des critères cliniques, radiologiques et moléculaires. Les troubles se manifestent par une ataxie cérébelleuse et un tremblement d'intention. D'autres symptômes tels que déclin cognitif, neuropathie périphérique et incontinence sont retrouvés. L'IRM cérébrale montre des hypersignaux périventriculaires et des lésions de la substance blanche au niveau des pédoncules cérébelleux moyens.

Ces troubles ne sont pas associés à la mutation complète mais uniquement à la prémutation. Les mécanismes physiopathologiques sont analogues à ceux en cause dans la dystrophie myotonique de type 1 mais sont moins bien caractérisés à ce jour. Il s'agit d'un gain de fonction toxique de l'ARN messager FMR1 contenant l'expansion CGG (notamment celles de plus de 70 CGG) et qui est surexprimé.

Diagnostic et conseil génétique

Étant donné qu'il n'existe pas de mutation *de novo*, lorsqu'un patient est diagnostiqué FXS, quel que soit son sexe, c'est sa mère qui lui a transmis la mutation et elle est porteuse d'une prémutation ou d'une mutation complète. Elle a un risque (≤ 50 %) d'avoir un autre enfant atteint et toutes les femmes de sa famille sont potentiellement également à risque. Le conseil génétique doit englober les informations sur le risque de d'insuffisance ovarienne primaire pour les jeunes femmes porteuses d'une prémutation afin qu'elles puissent en tenir compte dans leur projet parental, cette atteinte pouvant impacter la fertilité dès l'âge de 30 ans, voire plus tôt. En ce qui concerne les analyses fami-

liales, un test réalisé pour déterminer si un apparenté sain est porteur d'une prémutation constitue un test de porteur sain pour le syndrome de l'X fragile mais également un test présymptomatique pour FXTAS, même si la pénétrance est incomplète, et doit donc être conduit comme tout diagnostic de ce type (voir ci-dessous la partie consacrée à maladie de Huntington).

De manière importante, les diagnostics de FXPOI et FXTAS sont des portes d'entrées sur le risque de survenue de FXS dans les familles. La possibilité d'insuffisance ovarienne primaire associée à l'X fragile en particulier doit être évaluée avant toute procréation médicale assistée (PMA).

Un conseil génétique basé sur le mode de transmission des prémutations et mutations permettra de définir qui sont les personnes à risque afin de leur proposer un diagnostic moléculaire pour déterminer leur statut et éventuellement un diagnostic prénatal (ou préimplantatoire [DPI]) pour FXS en cas de demande. Il faut préciser qu'en cas de diagnostic prénatal pour un fœtus féminin porteur d'une mutation complète, il n'est pas possible d'établir un pronostic sur une éventuelle atteinte. En effet, la moitié des femmes seulement expriment une déficience intellectuelle. Ceci est lié au fait que les femmes ont deux chromosomes X dont l'un est inactivé au hasard dans chaque cellule. En moyenne, 50 % des neurones d'une femme porteuse de mutation complète sont déficients en protéine FMRP. La sévérité éventuelle de l'atteinte cognitive est probablement liée à un ratio d'inactivation en défaveur du chromosome X normal au niveau cérébral (on parle de biais d'inactivation), mais il n'y a de possibilité d'explorer ce tissu.

Le diagnostic préimplantatoire est possible pour FXS, avec une réserve pour les femmes porteuses d'une prémutation en raison d'une possible insuffisance ovarienne primaire.

Prise en charge

La prise en charge actuelle du syndrome de l'X fragile repose sur des approches éducatives et comportementales, complétées si nécessaire par des traitements pharmacologiques symptomatiques des manifestations comportementales (hyperactivité, par exemple). Des données d'étude de modèle souris ont suggéré une hypersignalisation glutamatergique liée au récepteur métabotrope mGluR5 et un déficit de la voie de signalisation GABAergique, ce qui a orienté vers des essais cliniques de traitement (de 2011 à 2013) avec des antagonistes des récepteurs mGluR5 ou un agoniste GABAergique, mais ces essais se sont révélés décevants (en 2014).

L'ataxie de Friedreich

Clinique, génétique et mécanisme pathologique

L'ataxie de Friedreich (FRDA) est une maladie de transmission autosomique récessive qui touche environ 1 personne sur 50 000 en France. C'est la forme la plus fréquente d'ataxie récessive. La maladie débute le plus souvent entre 5 ans et 18 ans, mais parfois à l'âge adulte. Elle se présente par des troubles de la coordination des mouvements, une dysarthrie, souvent associés à d'autres signes neurologiques (abolition des réflexes ostéotendineux, troubles de la sensibilité profonde), sans atteinte des fonctions cognitives, et au développement d'une scoliose. La plupart des patients développent une cardiomyopathie hypertrophique ou d'autres troubles cardiaques souvent responsables d'une diminution de l'espérance de vie. Un diabète est présent dans 10 à 20 % des cas. La maladie évolue progressivement avec perte de la marche autonome après 10 à 20 ans d'évolution.

La mutation dynamique qui affecte le gène *FRDA* est une expansion de grande taille d'une répétition du trinucéotide (GAA) dans l'intron 1, qui entraîne une modification épigénétique de la structure chromatinienne du gène (acétylation et méthylation d'histones, à l'origine d'une hétérochromatisation localisée) et une diminution (mais pas une abolition) de sa transcription et donc de la synthèse de la protéine correspondante, la frataxine. Cette protéine mitochondriale est impliquée dans la biogénèse des protéines à noyau fer-soufre, présentes notamment dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Il s'agit donc d'une mutation dite « hypomorphe » (diminution mais pas suppression de la fonction).

Diagnostic et conseil génétique

La recherche de l'expansion à l'état homozygote est un test réalisé en routine en diagnostic. Dans de très rares cas, l'expansion est présente à l'état hétérozygote, et il faut alors chercher une mutation du gène *FRDA* sur l'autre allèle. Le diagnostic prénatal est possible pour un couple dont chaque conjoint est porteur hétérozygote d'une mutation, ce qui est notamment toujours le cas pour le couple parental d'un patient. Les demandes de diagnostic prénatal sont toutefois assez rares pour les parents d'un patient atteint car le diagnostic est posé la plupart du temps chez l'enfant ou l'adolescent à un moment où les parents n'ont plus de projet parental. Il y a indication à proposer la recherche de porteurs hétérozygotes chez les apparentés proches

non atteints et majeurs, dans le cadre d'un conseil génétique pour projet parental car, dans ce cas, la recherche de l'expansion, qui est la mutation de loin la plus fréquente, pourra être recherchée chez le conjoint pour déterminer s'il y a un risque de récurrence et s'il y a lieu de proposer un diagnostic prénatal.

Prise en charge

La prise en charge est symptomatique et nécessite un suivi neurologique, cardiologique et une prise en charge d'une éventuelle scoliose ou d'un diabète. De nouveaux traitements visant à restaurer la fonction mitochondriale ou à cibler les modifications épigénétiques du gène *FRDA* secondaires à l'expansion sont en cours d'évaluation. Des résultats prometteurs de thérapie génique ont été obtenus sur des modèles souris de la maladie (travaux de Puccio et Aubourg), mais le passage à la thérapie chez l'homme sera probablement de longue haleine.

Maladies à expansion de polyglutamine

Clinique, génétique et mécanisme pathologique

Plusieurs pathologies neurodégénératives sont dues à des expansions de polyglutamine (polyQ) dans des protéines spécifiques. Les mutations en cause sont des répétitions CAG qui se trouvent dans la partie codante des gènes en cause et les expansions ne dépassent qu'exceptionnellement 100 CAG (100 glutamines consécutives dans la protéine correspondante). Le mode de transmission est autosomique dominant (à l'exception de l'amyotrophie spinobulbaire ou SBMA, de transmission récessive liée au X, voir plus bas). L'âge d'apparition est en général vers 30–50 ans, mais il existe des formes juvéniles et des formes plus tardives. On peut observer un phénomène d'anticipation concernant l'âge d'apparition avec un biais de transmission paternel vers les formes juvéniles pour la maladie de Huntington (MH) et certaines ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes (SCA).

La MH a une prévalence de 1/10 000 personnes. La maladie est d'évolution progressive et associe des troubles moteurs à des mouvements involontaires (chorée), des troubles de l'équilibre, une dysarthrie, une dysphagie et des troubles de l'élocution, une détérioration progressive des fonctions cognitives (notamment perte de mémoire et

difficulté de concentration), évoluant progressivement vers une démence et un état grabataire. Des troubles psychiatriques (dépression, apathie, irritabilité, anxiété) constituent souvent des symptômes précoces. Environ 6 % des patients sont atteints avant l'âge de 20 ans, presque toujours par transmission paternelle. La forme de l'enfant est différente, se présentant avec des mouvements lents et raides, des difficultés d'apprentissage et, dans certains cas, des anomalies du comportement ou une épilepsie.

Le gène, qui comporte la répétition CAG dans son premier exon, code pour une très grande protéine (plus de 3 100 aa), la huntingtine. À partir de 40 répétitions, la pénétrance de la maladie est complète, alors qu'entre 37 et 39 répétitions, elle est incomplète. La majorité des mutations comportent entre 40 et 60 répétitions CAG. Il existe une corrélation statistique entre le nombre de répétitions et l'âge d'apparition de la maladie mais qui ne permet pas une prédiction individuelle, mis à part dans les tailles extrêmes (une mutation comportant plus de 70 répétitions a une très forte probabilité d'être liée à une atteinte débutant avant l'âge de 20 ans). Une mutation comportant 45 répétitions CAG correspond à un âge d'apparition de la maladie en moyenne aux environs de 42 ans, mais compris dans un intervalle allant de 25 à 60 ans.

Les ataxies spinocérébelleuses (SCA, pour *spinocerebellar ataxia*) de forme 1, 2, 3 et 7 sont également liées à des mutations de polyglutamine, sont de transmission autosomique dominante et touchent environ 1/100 000 personnes. C'est un groupe cliniquement hétérogène caractérisé par une dégénérescence cérébelleuse et dont les signes cliniques communs sont une ataxie progressive affectant la marche et la posture, et souvent dysphagie et dysarthrie.

Une expansion de polyglutamine est également responsable de l'amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X (SBMA, pour *spinobulbar muscular atrophy*), maladie très rare qui touche un homme sur 150 000. Le gène en cause code pour le récepteur aux androgènes. Des mutations perte de fonction sont décrites dans ce gène, qui conduisent chez les sujets de caryotype XY à un phénotype féminin par perte totale de fonction du récepteur aux androgènes (syndrome d'insensibilité aux androgènes). Le mécanisme en cause dans SBMA est un gain de propriété toxique du récepteur aux androgènes (AR), entraînant une dégénérescence spécifique de motoneurons et la maladie se présente comme une maladie récessive liée à l'X (les femmes ne sont qu'exceptionnellement atteintes). La spécificité masculine de l'atteinte correspondant au mode de transmission lié à l'X est renforcée par le rôle des androgènes, car la toxicité de la protéine mutée nécessite la translocation vers le noyau du récepteur, induite dans la cellule par la liaison aux

androgènes. Il existe aussi une perte partielle de fonction partielle du récepteur qui conduit à une gynécomastie chez les hommes.

Le mécanisme pathologique commun aux maladies par expansions de polyglutamine est une toxicité des protéines mutées. Les protéines avec expansion polyQ (et surtout, comme dans la maladie d'Huntington, des fragments de clivage contenant la répétition polyQ) s'accumulent progressivement (par insuffisance de dégradation) et s'agrègent sous forme d'inclusions nucléaires ou cytoplasmiques. La présence des protéines à expansion de polyQ entraîne, par des mécanismes complexes imparfaitement connus, la dysfonction puis la mort des cellules neuronales dans différentes régions du cerveau selon la pathologie. La sélectivité de ces atteintes (striatum, noyau caudé, putamen et, ultérieurement, le cortex cérébral pour MH, le cervelet dont les cellules de Purkinje pour la plupart des SCA, les motoneurons et le bulbe rachidien pour SBMA) n'est que très mal comprise : elle peut être la résultante des niveaux d'expression et des fonctions de ces protéines dans différentes populations neuronales, ainsi que de l'instabilité somatique des répétitions CAG (l'instabilité des expansions MH est particulièrement marquée dans le striatum, générant des expansions plus longues et donc plus toxiques).

Diagnostic et conseil génétique

Le diagnostic moléculaire des répétitions CAG en cause dans les maladies à polyglutamine est effectué en routine pour la confirmation du diagnostic clinique. Pour ces maladies, d'apparition tardive, il est possible de proposer un test présymptomatique à une personne à risque lorsqu'elle est majeure, ceci dans le cadre d'une consultation pluridisciplinaire spécifique. Un diagnostic prénatal peut être proposé lorsque l'un des parents est porteur d'une mutation. Le diagnostic préimplantatoire peut parfois être réalisable sans détermination du statut du parent ayant 50 % de risque d'être porteur de la mutation, ce qui est une demande fréquente des couples. Cette possibilité, qui doit être étudiée au cas par cas, dépend de la disponibilité des prélèvements des parents de la personne à risque dans le couple et de l'informativité des marqueurs polymorphiques utilisés pour un tel diagnostic préimplantatoire.

Prise en charge

La prise en charge est symptomatique. Pour la maladie de Huntington, des médicaments neuroprotecteurs sont à l'étude. Des études précliniques de thérapies géniques

(sur modèles cellulaires ou de souris) dont les stratégies utilisent des oligonucléotides antisens (ASO, pour *antisense oligonucleotides*) ou des *small interfering RNA* (siRNA) pour cibler et détruire les ARN messagers mutés ou empêcher leur traduction, prévenant ainsi les effets toxiques. Pour la maladie de Huntington, des essais de thérapie cellulaire par transplantation striatale de neurones fœtaux humains avaient montré des résultats initialement encourageants de stabilisation ou même d'amélioration clinique chez un petit nombre de patients traités, mais qui se sont révélés transitoires, la dégénérescence neuronale progressant dans les régions non traitées du cerveau.

Myotonies dystrophiques DM1 et DM2

Clinique, génétique et mécanisme pathologique

La myotonie dystrophique de type 1 (DM1) ou maladie de Steinert, de loin la plus fréquente, est due à une répétition CTG dans la partie 3'UTR du gène *DMPK*. Le mode de transmission est autosomique dominant et la prévalence est de 1/8 000. Il s'agit d'une maladie multisystémique qui se présente avec une très grande variabilité d'expression clinique ([tableau 22.2](#)).

Il existe une corrélation statistique entre le nombre de répétitions et la forme clinique, mais qui ne permet pas une prédiction individuelle, mis à part en cas d'expansion de très petite ou très grande taille. La sévérité est très variable dans une même famille avec un phénomène d'anticipation très marqué, où l'on peut typiquement observer des grands-parents asymptomatiques au niveau musculaire, une fille qui exprimera une forme de l'adulte et un petit-fils ou une petite-fille qui exprimera la forme congénitale. Le biais de transmission vers les formes congénitales est maternel, la mère transmettrice pouvant n'exprimer qu'une forme clinique peu sévère ou même quasi asymptomatique.

Le mécanisme pathologique a été démontré comme étant un gain de propriété toxique de l'ARN. En effet, la répétition est dans la partie transcrite mais non traduite du gène. La production de protéine DMPK est peu altérée chez les patients DM1 mais l'ARN muté s'accumule dans le noyau sous forme de *foci* et interagit avec des protéines qui se fixent sur les répétitions CUG (notamment protéines *muscleblind*) et qui ont un rôle dans l'épissage alternatif de nombreux ARN messagers. Ces protéines séquestrées par les ARN DM1 mutés ne remplissent plus leur fonction normale, entraînant des anomalies d'épissage de leurs ARN cibles et les protéines correspondantes sont synthétisées sous une forme inadéquate. Ainsi, l'ARN messenger du gène *CLCN1* qui code pour un canal chlore musculaire est synthétisé sous sa

Tableau 22.2. Les différentes formes cliniques de myotonie dystrophique de type 1 (DM1) ou maladie de Steinert.

Formes cliniques	Âge de début	Symptomatologie musculaire	Autres signes cliniques
Minimes	Tardif	Nulle ou minime	Cataracte (100 % des patients après 50 ans) Calvitie
Classiques	Adolescence Adulte jeune	Myotonie Perte progressive de force musculaire Amyotrophie Ptosis, visage figé	Cardiopathie (troubles du rythme et/ou de la conduction parfois responsable de mort subite) Atteinte endocrinienne (diabète, hypogonadisme) Troubles cognitifs et comportementaux possibles
Congénitale	Naissance	Hypotonie musculaire généralisée Détrousse respiratoire aiguë	Déficiência intellectuelle sévère en cas de survie
Prénatale		Hydramnios Immobilité fœtale	

forme fœtale et non pas sous sa forme adulte, l'atteinte de ce canal étant la cause de la myotonie.

La myotonie dystrophique de type 2 (DM2) ou PROMM (*proximal myotonic myopathy*) est beaucoup plus rare que DM1. Elle est due à de très grandes expansions de répétitions CCTG dans un intron du gène *CNBP/ZNF9*. Elle présente des signes cliniques similaires à DM1 mais avec une atteinte musculaire plus proximale que distale. La maladie est moins sévère et l'évolution plus favorable avec notamment une atteinte cardiaque qui est moins fréquente, la quasi-absence de déficience intellectuelle et l'absence de forme congénitale.

Diagnostic et conseil génétique

Le diagnostic moléculaire de la mutation en cause est réalisé en routine pour DM1 (et de manière plus sélective pour DM2). Le test peut être réalisé dans le cadre de la confirmation du diagnostic clinique, dans un cadre de diagnostic anténatal (immobilité fœtale ou pour une famille à risque connue) ainsi que dans le cadre d'un diagnostic présymptomatique. En ce qui concerne DM1, bien qu'il n'y ait pas de traitement, le diagnostic présymptomatique est autorisé chez les mineurs car il permet de proposer une surveillance cardiaque spécifique. Ce test présymptomatique, comme pour un adulte, ne peut être réalisé qu'au sein d'une consultation pluridisciplinaire. Le diagnostic prénatal peut être proposé, mais il ne peut y avoir de prédiction du degré d'atteinte si le fœtus est porteur d'une expansion, mis à part dans le cas d'un nombre de répétitions très grand (> 1000) qui aura une forte probabilité d'être associé à une forme congénitale. Le diagnostic préimplantatoire est également possible.

Prise en charge

La prise en charge est symptomatique. Sur le plan cardiaque, une surveillance régulière doit être mise en place pour prévenir le risque de mort subite et des précautions particulières doivent être prises en cas d'anesthésie générale.

La création de modèles cellulaires à partir de cellules-souches de patients (notamment cellules pluripotentes induites/iPS) permet le criblage de molécules pouvant interférer avec la pathogénicité, conduisant à des essais cliniques (travaux du laboratoire I-Stem à Évry).

Comme pour la maladie de Huntington, des stratégies antisens visant à dégrader sélectivement l'ARN muté ont montré des résultats encourageants sur des modèles précliniques, mais le caractère multisystémique des manifestations cliniques rend de telles stratégies très difficiles chez l'homme.

Une expansion instable d'une répétition hexanucléotide (GGGGCC), cause génétique la plus fréquente de forme familiale de sclérose latérale amyotrophique et de démence frontotemporale

Clinique, génétique et mécanisme pathologique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA ou maladie de Charcot) est une très sévère maladie neurodégénérative progressive touchant sélectivement les motoneurons du cortex moteur, bulbe rachidien et moelle épinière et débutant le plus souvent après 55 ans. Elle entraîne une paralysie des membres, des muscles respiratoires et de ceux impliqués dans la déglutition et la parole, et est le plus souvent létale en quelques années. Elle survient en général de manière sporadique, mais des formes familiales rendent compte de 5 % des cas environ. La démence frontotemporale (DFT) est une maladie neurodégénérative également progressive caractérisée par des troubles comportementaux (par exemple apathie et désinhibition, pouvant aller jusqu'à des troubles psychotiques) associés à un déficit cognitif touchant essentiellement les fonctions exécutives (la différenciant ainsi des déficits touchant la mémoire de la maladie d'Alzheimer). Si SLA et DFT paraissaient être deux pathologies bien différentes, au début des années 2000 ont été décrites des formes, notamment familiales, associant les deux maladies, parfois chez le même individu. Et si 50 % des cas sporadiques de SLA ne manifestent pas d'atteinte cognitive, dans environ 15 % des cas avait été mis en évidence une symptomatologie de type DFT. En 2011, plusieurs groupes de chercheurs ont identifié, dans de nombreuses

familles avec SLA et/ou DFT, une grande expansion instable d'une répétition du motif GGGGCC (appelé aussi G4C2) dans un intron d'un gène de fonction totalement inconnue, c9orf72 (c9 pour chromosome 9, ORF correspond à *open reading frame*, ou phase d'ouverte de lecture, terme indiquant que l'ARN correspondant à ce gène contient une phase de lecture débutant par un codon d'initiation pouvant coder pour une protéine, par opposition à la catégorie dite d'ARN non codants). Rapidement, il a pu être montré que cette expansion était la cause majeure de forme familiale de SLA et/ou DFT, sans anticipation évidente (retrouvée dans 40 % de formes familiales de SLA, et 25 % de formes familiales de DFT) et était retrouvée également chez environ 7 % des patients avec forme sporadique de SLA ou de DFT (dans des populations d'origine européenne).

De très nombreux travaux ont été consacrés depuis 2011 à divers aspects de cette pathologie, mais il reste encore de nombreuses zones d'ombre. Les différences d'expression clinique (SLA ou DFT ou combinaison des deux chez le même patient) pour des expansions de taille équivalente ne sont pas expliquées : l'importante instabilité somatique des grandes expansions dans c9orf72 pourrait être en cause, générant des tailles d'expansions très différentes dans diverses populations neuronales (motoneurons, neurones corticaux). La pathogénicité des répétitions de 30 à 100 est incertaine, étant très rare dans la population normale et chez les patients (l'expansion chez ces derniers étant le plus souvent comprise entre 1 000 et 3 000 répétitions).

Les mécanismes d'action de la mutation sont également incertains. Certaines études suggèrent une contribution possible de perte de fonction (diminution d'expression du gène). Mais le gain de propriété toxique paraît de loin le mécanisme le plus probable, soit par toxicité de l'ARN (sens et antisens) portant la répétition, s'accumulant dans des *foci* nucléaires dans les régions atteintes du cerveau et pouvant séquestrer et affecter la fonction de protéines se liant à ces ARN, comme pour la dystrophie myotonique. Toutefois, un autre mécanisme pourrait contribuer à la pathogénicité de l'expansion. Il s'agit de la traduction du motif répété dans des ARN mutés (sens ou antisens) ne nécessitant pas un codon d'initiation AUG (en anglais : *RAN-translation* pour *repeat-associated non-ATG translation*), ce qui permet la traduction dans différentes phases de lecture de protéines comportant un motif dipeptide (protéines DPR,

par exemple polyglycine-alanine, ou polyproline-arginine). Ces protéines, détectées par des anticorps spécifiques, sont un marqueur spécifique de la pathologie chez les patients et s'accumulent dans des inclusions intraneuronales, différentes des inclusions contenant la protéine TDP-43, également présentes chez les patients avec expansion et dans d'autres formes de SLA et DFT. Les protéines DPR pourraient avoir des propriétés toxiques, comme suggéré par des modèles expérimentaux.

Diagnostic et conseil génétique

La détermination de la présence d'une expansion dans c9orf72 est utile pour un diagnostic étiologique en cas de suspicion de SLA ou de DFT. La technique de *repeat primed* PCR (analogue à celle largement utilisée pour le syndrome de l'X fragile) permet de discriminer entre les allèles normaux (moins de 25 répétitions) et des allèles avec expansion. Mais elle ne permet pas de déterminer la taille de l'expansion entre des allèles entre 30 et 100 répétitions, de pathogénicité et pénétrance incertaines, et les grandes expansions clairement pathologiques. Seule la technique du *Southern blot*, assez délicate en ce cas en raison de l'instabilité somatique marquée, permet cette détermination en cas d'incertitude.

L'application au conseil génétique doit se faire avec beaucoup de précautions, car il reste encore des incertitudes sur la pénétrance en fonction de l'âge et de la taille de l'expansion dans l'ADN leucocytaire (qui, du fait de l'instabilité somatique de l'expansion, n'est qu'un reflet très imparfait de la situation dans le système nerveux) et sur la vitesse d'évolution, qui semble très variable, des formes de SLA liées à cette mutation. Le diagnostic présymptomatique, notamment dans des cas familiaux, peut s'inspirer du protocole utilisé pour la maladie de Huntington, en tenant compte notamment de l'âge de début, nettement plus tardif (60 ans en moyenne, avec toutefois une importante variabilité) que pour la MH.

Prise en charge

La connaissance de cette forme génétique de sclérose latérale amyotrophique et démence frontotemporale est beaucoup trop récente pour en déduire des prises en charge spécifiques autres que celles préconisées pour les formes sans diagnostic génétique de SLA ou de DFT.

ENTRAÎNEMENT 21 QCM

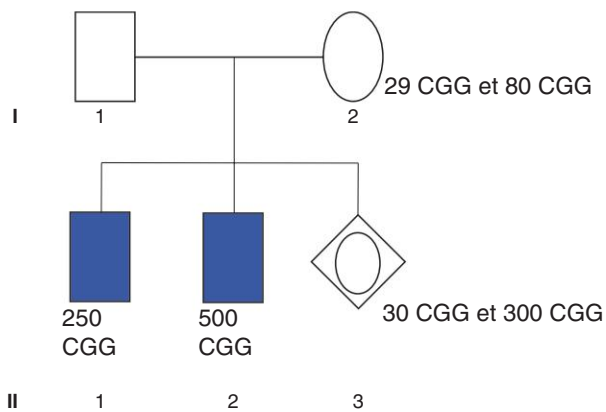
QCM 1

À propos des maladies qui sont causées par des mutations par expansion de répétitions, indiquez la/les proposition(s) vraie(s) :

- A. Il y a souvent des mutations *de novo*
- B. Le mécanisme pathologique est un gain de propriété toxique de la protéine mutée pour toutes les maladies par expansion
- C. Les altérations touchent toujours la séquence codante d'un gène
- D. On décrit sous le terme « anticipation » le fait que les signes cliniques tendent à apparaître de plus en plus tôt et/ou sont de plus en plus sévères au cours des générations.

QCM 2

Dans la famille représentée ci-dessous, les garçons II.1 et II.2 sont atteints du syndrome de l'X fragile (FXS). On a indiqué le nombre de triplets CGG dans le gène *FMR1* pour la mère et les enfants. Indiquez la/les proposition(s) vraie(s) :

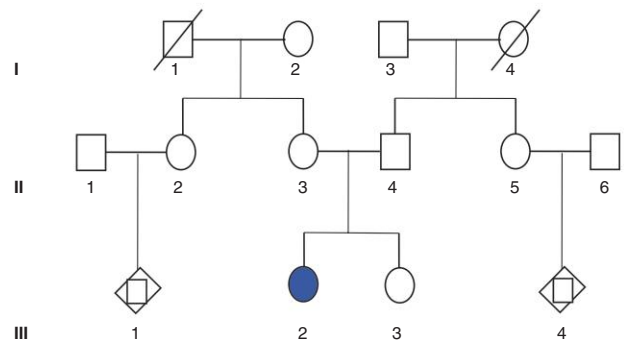


- A. Le garçon II.2 présente une déficience intellectuelle plus importante que son frère II.1
- B. La femme I.2 peut avoir des enfants porteurs d'un allèle normal, d'une prémutation ou d'une mutation complète
- C. Il n'y a pas d'autre cas de déficience intellectuelle dans la famille. I.2 rapporte simplement une ataxie chez son père depuis l'âge de 65 ans mais cela ne peut pas avoir de lien avec le gène *FMR1*

- D. Le génotype de II.4 a été déterminé dans le cadre d'un diagnostic prénatal et a mis en évidence chez le fœtus de sexe féminin respectivement 30 et 300 répétitions CGG. Vous annoncez aux parents qu'il s'agit d'une mutation complète et que le pronostic est le même que pour un garçon

QCM 3

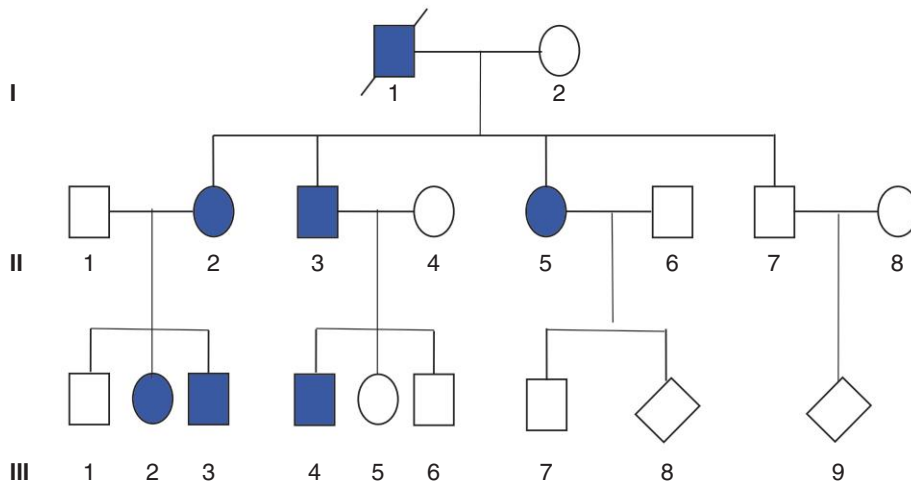
Dans la famille représentée ci-dessous, l'enfant III.2, fille âgée de 4 ans présente un retard des acquisitions et des troubles du comportement de type autistique qui a fait évoquer un syndrome de l'X fragile (FXS) qui a été confirmé par la mise en évidence d'une mutation complète dans le gène *FMR1*. Quelle(s) sont la/les proposition(s) juste(s) ?



- A. La mère ou le père de la patiente III.2 est porteur d'une prémutation et leurs sœurs respectives (II.2 et II.5), qui sont enceintes de garçons, sont à risque d'être porteuses de la mutation familiale et d'avoir un fils atteint de FXS. Vous préconisez de faire réaliser d'urgence une analyse génétique chez eux dans le cadre du conseil génétique pour II.2 et II.5
- B. Vous calculez que si II.3 est prémulée, sa sœur a 75 % de risque de l'être également
- C. Après analyse génétique, il s'avère que la mère de la patiente III.2 est porteuse d'une prémutation. Cette jeune femme, II.3, a 31 ans et le souhait d'un troisième enfant. Vous l'informez qu'étant porteuse d'une prémutation, sa fertilité peut être impactée
- D. Les enfants des patients porteurs d'une mutation du FXS sont tous porteurs d'une mutation complète car la mutation ne rétracte pratiquement jamais vers une prémutation ou un allèle normal

QCM 4

Concernant l'arbre généalogique représenté ci-dessous :
quelle(s) sont la/les proposition(s) juste(s) ?



A. La transmission la plus probable est liée à l'X et dominante

B. Si la maladie dans cette famille est la maladie de Huntington : le risque d'avoir un enfant atteint pour II.5 est 1/2 quel que soit le sexe de l'enfant

C. La maladie de Huntington étant une maladie de l'adulte, elle n'entre pas dans la définition des pathologies pour lesquelles un diagnostic prénatal peut être proposé

D. Si la maladie dans cette famille est la maladie de Huntington : le risque d'avoir un enfant atteint pour II.7, qui a 40 ans, est nul

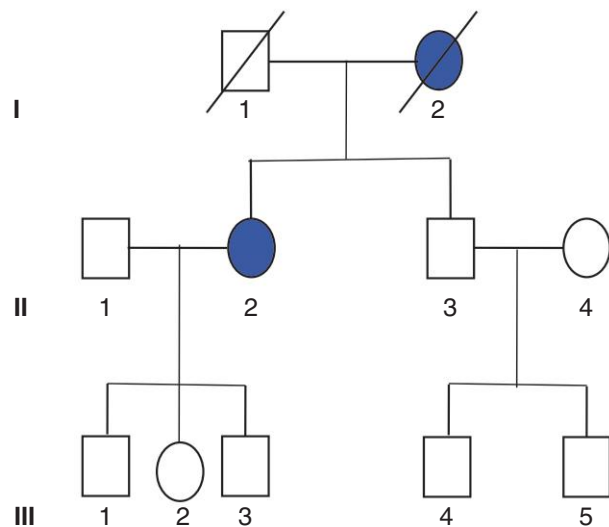
QCM 5

Dans la famille représentée ci-dessous, I.2 était atteinte de maladie de Huntington depuis l'âge de 46 ans et est décédée à l'âge de 63 ans. Sa fille II.2, âgée 46 ans, présente des mouvements choréiques depuis 3 ans. Les autres membres de la famille ne présentent aucun trouble, mis à part l'enfant III.5, âgé de 7 ans, qui présente des difficultés dans les apprentissages et depuis 3 mois des mouvements raides. Quelle(s) sont la/les proposition(s) juste(s) ?

A. Les troubles de l'enfant III.5 ne peuvent pas être en lien avec la maladie de Huntington observée chez sa grand-mère et sa tante paternelles, étant donné qu'il s'agit d'une maladie de transmission autosomique dominante et que son père, II.3, âgé de 42 ans, n'est pas atteint

B. Un test génétique est réalisé chez l'enfant III.5 qui confirme le diagnostic de maladie de Huntington : il est porteur d'une mutation comportant 75 répétitions CAG. Son père II.3 demande que le test génétique soit réalisé chez lui. La connaissance du nombre de répétitions de sa

mutation permettra de déterminer précisément à quel âge il sera atteint

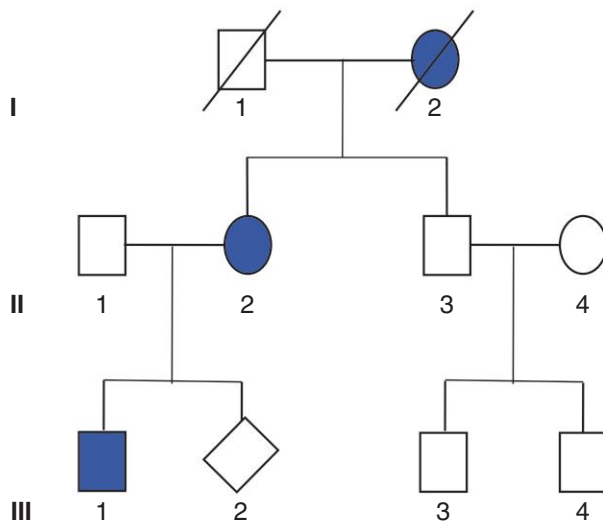


C. L'enfant III.4 a 11 ans et ne présente aucun signe moteur ou psychiatrique évocateur de la maladie de Huntington. On peut donc être rassurant : il n'est pas hérité la mutation de la maladie de Huntington

D. Le couple II.3-II.4 souhaite qu'un diagnostic présymptomatique soit réalisé pour leur fils aîné âgé de 11 ans (III.4). Étant donné la situation familiale, ce test peut être réalisé

QCM 6

Dans la famille dont l'arbre généalogique est représenté ci-dessous, la femme I.2, actuellement décédée, présentait une cataracte survenue vers 40 ans. La femme II.3 présente depuis l'âge de 20 ans une myotonie et des troubles du rythme cardiaque ayant nécessité la pose d'un pacemaker. La première grossesse de II.3 a été marquée par la survenue d'un hydramnios; à la naissance, l'enfant présentait une hypotonie majeure et une détresse respiratoire nécessitant une ventilation artificielle; l'enfant actuellement âgé de 4 ans présente une déficience intellectuelle sévère. Quelle(s) sont la/les proposition(s) juste(s) ?



A. Les signes cliniques décrits chez les trois personnes de cette famille ne peuvent pas être liés

B. Des analyses génétiques sont réalisées à partir de l'ADN pour les trois personnes atteintes et mettent en évidence respectivement 75, 500 et 2000 répétitions CTG chez I.2, II.2 et III.2. Ces génotypes expliquent les expressions cliniques

C. La grossesse actuelle de II.2 est au terme de huit semaines d'aménorrhée. Vous êtes rassurant car il y a un risque quasi nul d'avoir un autre enfant atteint d'une forme congénitale qui est une forme exceptionnelle de la maladie

D. Le couple II.1-II.2 demande la réalisation d'un diagnostic prénatal. Vous les informez que la détermination du génotype permettra de prédire précisément le degré d'atteinte de l'enfant à naître s'il a hérité une mutation

QCM 7

Dans le cas de la myotonie de Steinert, indiquez quelle(s) sont la/les proposition(s) juste(s) ?

A. C'est une maladie responsable d'une forme congénitale de maladie musculaire qui est extrêmement rare chez l'adulte

B. Une cataracte peut être la seule expression clinique de la myotonie de Steinert

C. Au sein d'une famille, si différentes formes cliniques sont observées, elles ont tendance à s'aggraver au cours des générations

D. Il n'y a pas d'atteinte cognitive dans la myotonie de Steinert

► Complément en ligne

Un complément numérique est associé à ce chapitre (il est indiqué dans le texte par un picto ). Il propose une photo supplémentaire. Pour voir ce complément, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 22.1

Quelques exemples de mutations par expansion instable.

Le codon d'initiation de la traduction (ATG) et un des trois codons de terminaison (TAA) sont représentés au début et à la fin de la région codant pour une protéine. Pour dix pathologies, la répétition en cause est précisée et sa position sur le gène est signalée par un triangle. Dans ces triangles sont symbolisés les groupes des allèles normaux (en vert); des allèles au-delà du seuil d'instabilité (en orange) et des allèles au-delà du seuil de pathogénicité (en rouge). Des expansions plus petites de répétitions exoniques du motif GCG codant pour des répétitions polyalanine sont associées à neuf maladies monogéniques, dont une forme de déficience intellectuelle avec ou sans épilepsie (gène *ARX*), la dystrophie musculaire oculopharyngée, ou le syndrome dit « d'Ondine » d'hypoventilation centrale, liée au gène *PHOX2B*). Les expansions polyalanines sont transmises de manière stable.



Oncogénétique

Thierry Frebourg

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	248
L'oncogénétique en pratique	250
Les cancers du sein et de l'ovaire héréditaires	252
Le cancer colorectal héréditaire	255

Introduction

L'oncogénétique est le secteur de la génétique consacré aux cancers héréditaires. Les cancers héréditaires sont les maladies mendéliennes les plus fréquentes et représentent aujourd'hui un des principaux motifs de consultation en génétique médicale. La caractérisation de leurs bases génétiques et l'élaboration de protocoles de prise en charge médicale personnalisée représentent une des plus grandes avancées de la génétique et de la cancérologie au cours des vingt dernières années. La France sous, l'égide de l'Institut national du cancer (INCa), a déployé un réseau de 126 sites de consultations d'oncogénétique bénéficiant de l'expertise de 25 laboratoires spécialisés en oncogénétique moléculaire. Cette organisation nationale et ce maillage territorial permettent de garantir une expertise et une équité de prise en charge (voir www.e-cancer.fr/soins/prises-en-charge-specifiques/oncogenetique).

Le cancer, une maladie génétique très particulière

Le cancer est, sur le plan génétique, une maladie extraordinaire car si la transformation cancéreuse d'une cellule résulte toujours d'altérations génétiques, ces altérations sont dans la majorité des cancers restreintes aux cellules tumorales et ces altérations sont dites somatiques (*sôma* en grec : corps). Le cancer est donc une maladie génétique somatique et, sur le plan épidémiologique, il est effectivement le plus souvent sporadique, survenant de façon isolée dans une famille. Ainsi, le cancer correspond à la forme la plus extrême du mosaïcisme génétique, défini par la présence chez un individu de tissus génétiquement différents mais provenant du même zygote. Les analyses extensives des exomes de tumeurs réalisées par des approches de séquençage nouvelle génération ont révélé que le nombre d'altérations génétiques présentes dans une cellule tumorale était de l'ordre de la centaine. Une minorité de ces altérations jouent un rôle de cause dans la transformation maligne : ces altérations sont qualifiées de *driver mutations* et le nombre de *driver mutations* nécessaire à la transformation maligne est de l'ordre de la dizaine. La plupart des altérations génétiques détectables dans le génome tumoral reflètent simplement l'instabilité génétique intrinsèque de la cellule cancéreuse. Ces mutations sont qualifiées de passagères ou de *passenger mutations*. La caractéristique essentielle de la cellule cancéreuse est en effet son instabilité génétique et c'est cette instabilité qui fait toute la gravité du cancer. Tel un génome viral ou bactérien sou-

mis à la pression d'antiviraux ou d'antibiotiques, le génome tumoral sera progressivement sélectionné pour échapper au système immunitaire de l'hôte et aux contraintes mécaniques des tissus environnants, s'adapter aux différentes localisations tissulaires lors de l'essaimage métastatique et résister progressivement aux chimiothérapies. Cette instabilité explique l'hétérogénéité génétique de toute tumeur maligne, les différentes zones tumorales ne présentant pas toutes les mêmes altérations. Les analyses exomiques comparatives de différents territoires d'une tumeur permettent de reconstituer la séquence des événements mutationnels intervenant de façon causale dans la transformation maligne et d'établir ainsi une véritable phylogénie mutationnelle tumorale.

Cancers sporadiques et cancers héréditaires

Si le cancer est le plus souvent une maladie génétique somatique, de présentation sporadique, environ 5 % des cancers correspondent à de véritables maladies héréditaires se transmettant selon un mode mendélien. En prenant comme exemple le cancer du sein, dont la fréquence en population générale est de l'ordre de 1/9, la fréquence des cancers héréditaires du sein peut être estimée à 1/200. Les cancers héréditaires résultent d'altérations constitutionnelles (c'est-à-dire présentes dans toutes nos cellules par opposition aux altérations somatiques) ou germinales (le terme anglais étant de celui de *germline*), transmises de génération en génération. Les cancers héréditaires se transmettent le plus souvent selon un mode autosomique dominant à pénétrance incomplète et plus rarement selon un mode autosomique récessif. Les altérations constitutionnelles à l'origine des formes mendéliennes de cancer ont pour effet commun de provoquer différents types d'instabilité génétique qui favoriseront la survenue d'altérations somatiques secondaires. Ainsi, le cancer héréditaire est la résultante d'altérations constitutionnelles suivies d'altérations somatiques, alors que les cancers sporadiques résultent de l'accumulation séquentielle d'altérations somatiques (figure 23.1). Le taux de mutation *de novo*, estimé récemment grâce aux études d'exomes de trio (cas index-parents) au moins à une mutation avec impact biologique par génération, suggère qu'une fraction significative de cancers sporadiques de survenue particulièrement précoce pourrait résulter de mutations *de novo*.

En règle générale, ce sont les mêmes gènes qui sont impliqués dans les cancers sporadiques et les cancers héréditaires. Le plus souvent, la différence n'est ni le gène ni le

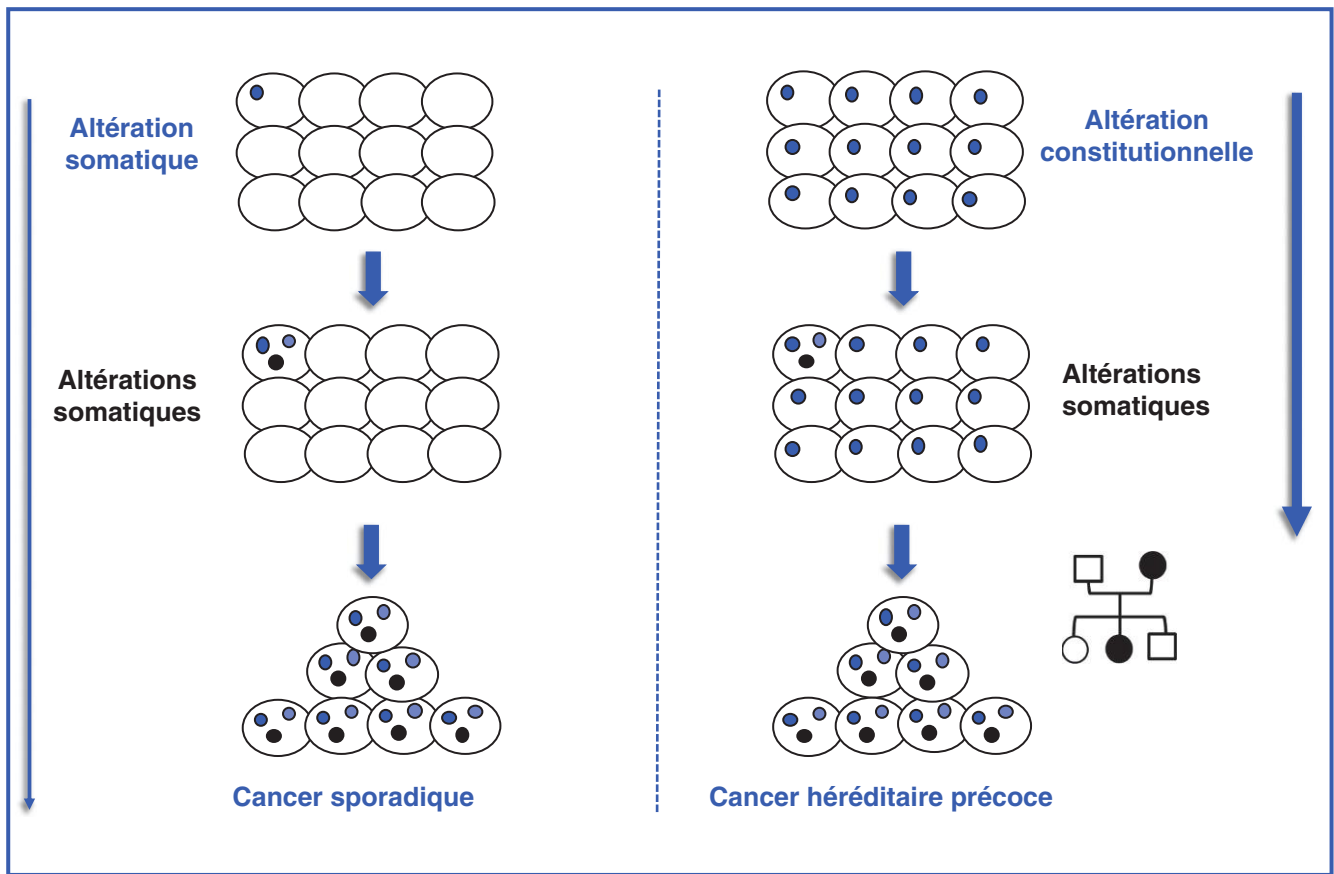


Figure 23.1

Bases génétiques des cancers sporadiques et des cancers héréditaires.

type d'altération, mais le niveau de survenue de l'altération, constitutionnelle ou somatique, ce qui permet d'avoir une vision unifiée de la transformation maligne.

Bases moléculaires de la transformation maligne

Les altérations géniques à l'origine de la transformation maligne, qu'elles soient somatiques ou constitutionnelles, ont comme dans toute maladie génétique deux types de conséquence : activation ou inactivation (figure 23.2). Les gènes touchés par les mutations activatrices sont les proto-oncogènes codant pour des protéines intervenant à toutes les étapes de la transduction du signal : facteurs de croissance, récepteurs transmembranaires, protéines cytosoliques et facteurs de transcription. Les mutations activatrices des proto-oncogènes ont pour conséquence biologique une activation permanente constitutive de la cascade de transduction indépendante de la signalisation normale, telle la fixation des facteurs de croissance sur des

récepteurs transmembranaires. Cette activation permanente conduit à une entrée en cycle cellulaire inappropriée et, les mécanismes de réparation de l'ADN étant rapidement dépassés, cette activation oncogénique provoque une instabilité génétique à l'origine d'altérations géniques secondaires.

Les mutations inactivatrices altèrent les gènes suppresseurs de tumeurs ou *tumor suppressor genes*. Cette catégorie regroupe en fait un ensemble hétérogène qu'il est préférable de dichotomiser en deux catégories : les gènes *gatekeepers* (littéralement « gardiens de porte ») et les gènes *caretakers* (« aides-soignants »). Les gènes *gatekeepers* codent pour des protéines assurant le rôle de **points de contrôle** entre les différentes phases du cycle cellulaire : G1, G2, S et M. En effet, dans une cellule normale, le passage d'une phase à la suivante exige que la phase soit correctement achevée afin de prévenir le risque d'une instabilité génétique. Les mutations inactivatrices des gènes *gatekeepers* ont pour conséquence biologique une dérégulation du cycle cellulaire, une dérégulation de la cascade de transduction et une instabilité génétique.

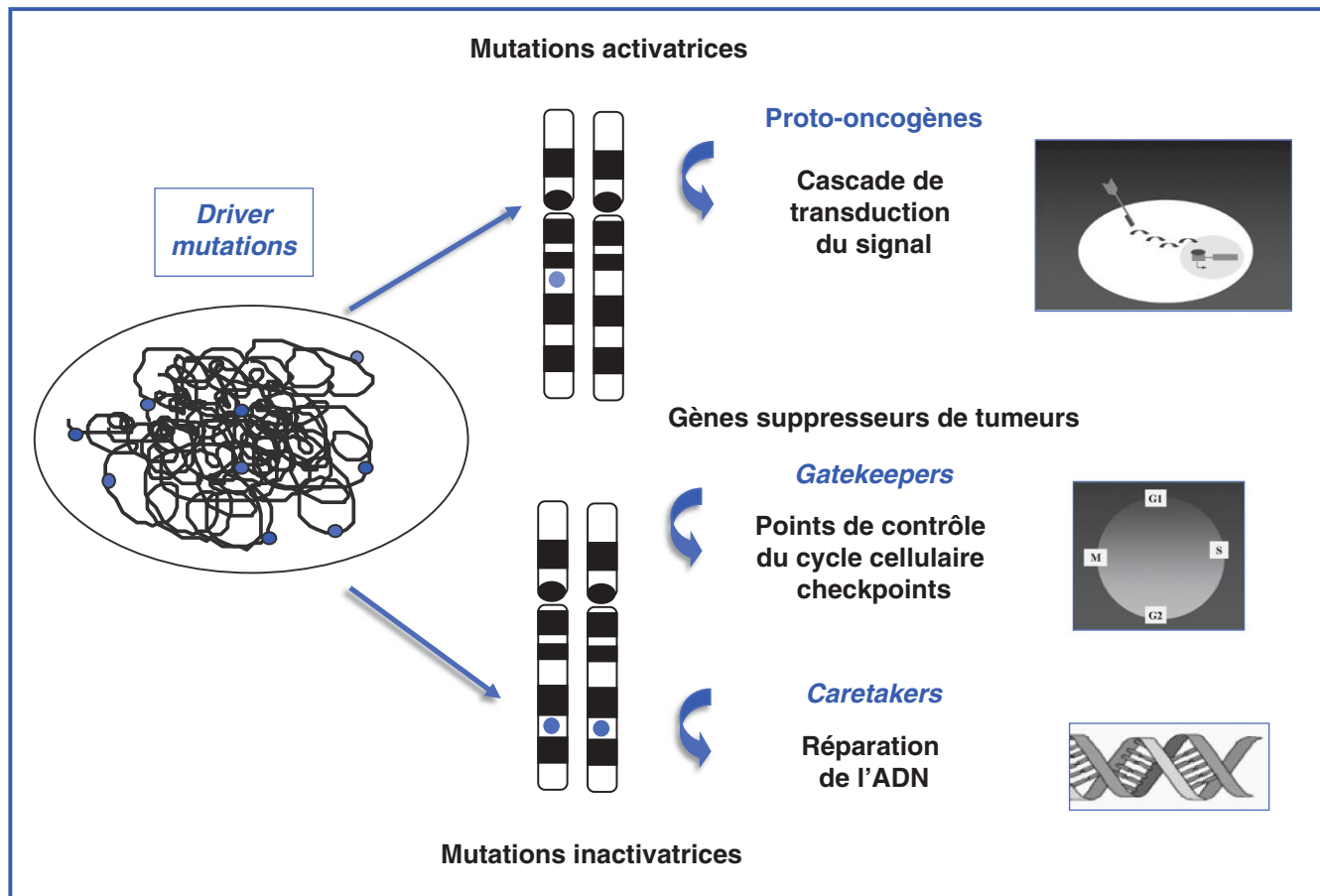


Figure 23.2

Bases moléculaires de la transformation maligne.

Les gènes *caretakers* codent pour les protéines intervenant dans les différents **systèmes de réparation de l'ADN** : correction des bases mal appariées résultant d'erreurs de la réplication (*mismatch repair* [MMR]), réparation des cassures d'ADN double brin par recombinaison homologue (*homologous recombination of double strand DNA breaks repair* [HRDSB]), réparation par excision des bases (*base excision repair* [BER]). Les mutations inactivatrices des gènes *caretakers* provoquent différents types d'instabilité génétique qui faciliteront la survenue d'autres altérations oncogéniques.

Au niveau cellulaire, les mutations activatrices hétérozygotes ont un effet biologique puisqu'elles induisent un gain de fonction. Cela explique pourquoi les formes héréditaires de cancers dues à des mutations constitutionnelles activatrices de proto-oncogènes ont une pénétrance le plus souvent complète. En revanche, les mutations inactivatrices, qu'elles touchent les gènes *gatekeepers* ou *caretakers* nécessitent le plus souvent, pour qu'elles aient une expression biologique, l'inactivation de l'autre allèle. Dans les formes héréditaires de cancers dues à des mutations inactivatrices,

cette nécessité de double évènement – mutation constitutionnelle puis mutation somatique – est connue sous le nom de *double hit* ou **modèle de Knudson et Comings**. Cette séquence explique pourquoi les formes héréditaires de cancers, qui le plus souvent résultent de mutations constitutionnelles inactivatrices de gènes *caretakers* ou *gatekeepers*, se caractérisent par une pénétrance incomplète. Le [tableau 23.1](#) présente les différentes formes mendéliennes de cancers en fonction des leurs bases moléculaires.

L'oncogénétique en pratique

Quand évoquer une forme héréditaire de cancer ?

Quel que soit le type de cancer, trois éléments chez un(e) patient(e) sont évocateurs d'une forme héréditaire de cancer (voir encadré ci-dessous) :

Tableau 23.1. Bases moléculaires des formes héréditaires de cancer.

Forme héréditaire de cancer	Gène	Voie(s) biologique(s)
I. Activation constitutive de la cascade de transduction		
Cancer médullaire de la thyroïde (CMT)	<i>RET</i>	ERK, AKT, MAPK, JNK, STAT
Cancer papillaire du rein	<i>MET</i>	ERK, PI3K/AKT, MAPK, RAS, STAT
Maladie de Cowden	<i>PTEN</i>	PI3K, AKT, VEGF, PTEN/PI3K/Akt/VEGF, etc.
Syndrome de Gorlin	<i>PTCH</i>	<i>Sonic hedgehog</i>
Médulloblastome	<i>SUFU</i>	
Neurofibromatose de type I	<i>NF1</i>	RAS signaling
Maladie de Von Hippel Lindau	<i>VHL</i>	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
Polypose adénomateuse familiale	<i>APC</i>	Voie de la β -caténine
II. Altération des points de contrôles du cycle cellulaire		
Rétinoblastome	<i>RB1</i>	G1/S, mitose
Mélanome malin	<i>CDKN2A</i>	Voie RB
Syndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	G1/S, G2/M
III. Altération des systèmes de réparation de l'ADN		
Syndrome de Lynch	<i>MSH2, MLH1, MSH6, PMS2</i>	<i>Mismatch repair (MMR)</i>
Cancer du sein et de l'ovaire	<i>BRCA1, BRCA2</i>	<i>Homologous recombination mediated double strand break repair (HRDSB)</i>
Polypose adénomateuse autosomique récessive	<i>MUTYH</i>	<i>Base excision repair (BER)</i>
Xeroderma pigmentosum	XP	<i>Nucleotide excision repair (NER)</i>

- **la précocité de survenue** du cancer. La majorité des cancers héréditaires se développent avant l'âge de 51 ans et même s'il existe une variabilité, même intrafamiliale,

dans les âges au diagnostic, il existe le plus souvent dans les familles atteintes de formes mendéliennes de cancer des cas précoces;

- **l'histoire familiale.** La majorité des formes mendéliennes de cancer résultant de mutations transmises, il existe le plus souvent une histoire familiale dense. La pénétrance incomplète, à l'origine de sauts de génération, impose de prendre en considération les antécédents de cancer non seulement au niveau des apparentés du premier mais aussi du deuxième degré. Les antécédents familiaux de cancers doivent être toujours analysés par rapport à la taille de la famille. En effet, compte tenu de la fréquence du cancer en population générale, une agrégation familiale de cancers dans une grande famille ne sera forcément pas synonyme d'une forme mendélienne de cancer;

- **le développement de plusieurs tumeurs primitives.** Les patient(e)s présentant une mutation constitutionnelle prédisposant au cancer ont un risque élevé de développer plusieurs tumeurs primitives indépendantes puisque la mutation est présente dans toutes les cellules de l'organisme. La nature multifocale, c'est-à-dire le développement de plusieurs foyers tumoraux, et la présentation bilatérale du cancer ont la même signification. Il est à noter que le vieillissement de la population permet d'observer chez les personnes âgées, qui étaient indemnes de cancer, à partir de 70–80 ans le développement en rafale de cancers primitifs multiples. Ces cancers tardifs résultent très probablement d'altérations épigénétiques associées à l'âge. Par conséquent, le développement de plusieurs tumeurs primitives multiples est un critère évocateur d'une forme mendélienne de cancer, à condition que la première soit survenue avant l'âge de 51 ans.

Cette triade – précocité, histoire familiale, développement de tumeurs primitives multiples – est la règle essentielle que doit retenir tout médecin pour envisager une forme héréditaire de cancer et adresser le patient vers une consultation spécialisée d'oncogénétique. À cette triade, s'ajoutent plus rarement des éléments syndromiques correspondant à des éléments malformatifs tels des anomalies squelettiques, une macrocrânie ou une dysmorphie.

Présentations cliniques évocatrices d'une forme héréditaire de cancer

- Précocité du cancer < 51 ans.
- Antécédents familiaux de cancers précoces chez les apparentés au premier ou deuxième degré.
- Développement de plusieurs tumeurs primitives, la première < 51 ans.
- Association à des éléments malformatifs.

Déroulement des consultations d'oncogénétique

Comme pour toute maladie génétique, la première consultation d'oncogénétique doit s'effectuer si possible chez le cas index, adressé par le médecin traitant, gastro-entérologue, gynécologue, pédiatre, oncologue, chirurgien... afin de pouvoir proposer une analyse génétique à partir d'une prise de sang si, à l'issue de la consultation, le diagnostic de forme mendélienne de cancer est envisagé. La première consultation a pour objectif d'établir les antécédents personnels et familiaux de cancers en validant les données médicales par l'obtention en particulier des comptes rendus anatomopathologiques, éléments essentiels au dossier. Comme dans toute consultation de génétique la règle essentielle est, avant de réaliser l'analyse génétique, d'anticiper les conséquences d'une analyse génétique positive en matière de prise en charge médicale, à la fois pour le cas index et ses apparentés. Il est important de souligner que les patient(e)s vu(e)s en consultation d'oncogénétique ont souvent une histoire médicale lourde personnelle et familiale et sont parfois en cours de traitement.

L'identification chez le cas index de la mutation constitutionnelle causale permettra dans un second temps de proposer aux apparentés asymptomatiques à risque génétique une **analyse présymptomatique** basée sur la recherche ciblée de l'altération identifiée. Il sera alors possible, chez les apparentés non porteurs de la mutation familiale, de lever une inquiétude illégitime et une surveillance médicale inappropriée, leur risque de développer un cancer étant celui de la population générale et chez les apparentés porteurs de leur proposer une prise en charge personnalisée permettant de détecter de façon précoce des tumeurs voire de supprimer le risque tumoral par chirurgie prophylactique. Même si le bénéfice médical de cette prise en charge présymptomatique est le plus souvent majeur, il est important de proposer un **accompagnement psychologique** afin que ce bénéfice médical ne soit pas contrebalancé par un impact psychologique négatif.

Les cancers du sein et de l'ovaire héréditaires

Épidémiologie, déterminisme génétique

Les cancers du sein et de l'ovaire héréditaires représentent la forme la plus fréquente de cancer héréditaire se transmettant selon un mode mendélien et constituent le prin-

cipal motif de consultation d'oncogénétique. Les deux gènes impliqués dans ces formes sont les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (*breast cancer 1 and 2*), respectivement localisés en 17q21 et 13q12.3. Approximativement 1 femme sur 300 est porteuse d'une mutation d'un des gènes *BRCA*. Fin 2014, environ 20 000 personnes porteuses d'une mutation d'un des gènes *BRCA* ont été identifiées en France.

Il est à noter que d'autres gènes sont impliqués dans le risque génétique de cancer du sein : le gène *TP53* à l'origine du **syndrome de Li-Fraumeni**, une forme héréditaire de cancer beaucoup plus rare touchant l'enfant et l'adulte jeune et remarquable par la diversité de son spectre tumoral (sarcomes, ostéosarcomes, tumeurs cérébrales, corticosurrénales, cancers du sein). Dans le syndrome de Li-Fraumeni, le cancer du sein de la femme est le risque tumoral majeur à l'âge adulte et survient le plus souvent avant 31 ans. Le cancer du sein représente également le principal risque du **syndrome de Cowden** ou maladie des hamartomes multiples, facilement reconnaissable par l'existence d'une macrocrairie. Ce syndrome résulte d'altérations constitutionnelles du gène *PTEN*. Les altérations constitutionnelles des gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* et *PTEN* n'expliquent pas toutes les formes précoces ou les agrégations familiales de cancer du sein. D'autres gènes intervenant dans les mêmes voies biologiques que *BRCA*, tels les gènes *ATM*, *RAD51C*, *PALB2*, *BRIP1*, *PALB2* et *CHECK2* sont probablement impliqués mais il est actuellement, en dehors du gène *PALB2*, prématuré de les analyser au titre du diagnostic, car la pénétrance de leurs mutations reste à caractériser.

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

L'identification des gènes *BRCA1* et *BRCA2* en 1994 a constitué une étape historique de la génétique médicale. Ces gènes jouent un rôle clef dans la réparation des cassures d'ADN double brin (*DNA double-strand breaks* [DSB]) par recombinaison homologue (*homologous recombination* [HR]) en association avec les protéines RAD50, MRE11, NBS1, RAD51, XRCC2 et XRCC3. Les cassures d'ADN double brin peuvent être également réparées par un autre système de réparation moins fidèle, le système NHEJ (pour *non-homologous end-joining*), qui change la séquence originelle et provoque une accumulation d'altérations génétiques. En cas d'inactivation de la protéine *BRCA1* ou *BRCA2*, les cassures d'ADN double brin ne peuvent être réparées que par le système NHEJ, ce qui conduit à un haut niveau d'instabilité génétique avec cassures chromosomiques, aneuploïdie et amplification du centrosome. Les mutations délétères des gènes *BRCA* sont des mutations inactivatrices de tout type,

mutations stop, mutations faux-sens, mutations d'épissage délétions/insertions nucléotidiques, *frameshift* ou en phase, délétions ou duplications génomiques et ces altérations sont distribuées tout le long des gènes. Cette hétérogénéité allélique, la grande taille de la séquence codante de ces gènes et le fait qu'une proportion estimée à 20 % des variations détectées chez les patientes soit des variations de signification inconnue imposent que ces analyses soient effectuées dans des laboratoires spécialisés dans la détection de ces altérations et leur interprétation.

Caractéristiques des cancers du sein associées aux mutations des gènes *BRCA*

L'encadré ci-dessous présente les situations cliniques évocatrices d'une mutation des gènes *BRCA*. Les cancers du sein par mutation des gènes *BRCA* se caractérisent par leur précocité et surviennent en règle générale avant 50 ans. Ils sont souvent de nature multifocale et de présentation bilatérale touchant simultanément ou successivement les 2 seins. Sur le plan histopathologique, il s'agit d'adénocarcinomes de type canalaire, lobulaire ou médullaire en notant que le type canalaire est le plus fréquemment observé chez les porteuses de mutation des gènes *BRCA* et que le type médullaire, plus rare en population générale, est évocateur d'une mutation *BRCA*, s'il survient chez une femme jeune. Une spécificité particulière des cancers du sein par mutation des gènes *BRCA*, en particulier *BRCA1*, est leur profil histopathologique « triple négatif » vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et de l'amplification d'*ERBB2*, systématiquement recherchée car cette amplification signe une sensibilité aux thérapies ciblées correspondant aux anticorps anti-*ERBB2*. Les cancers de sein par mutation des gènes *BRCA* sont le plus souvent des tumeurs agressives, de grade élevé sur le plan pathologique et de croissance particulièrement rapide. Les cancers du sein par mutation du gène *BRCA1* sont manifestement plus agressifs que ceux dus aux mutations du gène *BRCA2*, ce qui a conduit à moduler les protocoles de prise en charge en fonction du gène impliqué. Le risque cumulé à 70 ans de développer un cancer du sein chez les porteuses d'une mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* est estimé à 60 et 46 %, respectivement, soit un risque relatif de l'ordre de 6 à 5 par rapport à la population générale. Les cancers du sein chez l'homme sont si rares que la survenue d'un cancer du sein chez un homme de moins de 70 ans est évocatrice d'une mutation d'un gène *BRCA*.

Présentations cliniques évocatrices d'une mutation d'un gène *BRCA*

- Cancer du sein < 36 ans.
- Cancer du sein triple négatif < 51 ans.
- Cancer du sein bilatéral, le premier < 51 ans.
- Cancer du sein chez l'homme < 71 ans.
- Cancer de l'ovaire < 61 ans.
- Cancer du sein < 51 ans chez une patiente et cancer de l'ovaire chez une apparentée au premier ou second degré.

Caractéristiques des cancers de l'ovaire associées aux mutations des gènes *BRCA*

Les cancers de l'ovaire se développant chez les porteuses d'une mutation d'un gène *BRCA* sont le plus souvent des adénocarcinomes de l'ovaire de type séreux de haut grade et de stade avancé. Les autres types histopathologiques, mucineux, endométrioïdes ou à cellules claires peuvent être observés. Ils surviennent dans la majorité des cas vers 50 ans, soit 5 à 10 ans avant ceux observés en population générale, et sont souvent bilatéraux. Le risque cumulé à 70 ans de développer un cancer de l'ovaire chez les porteuses d'une mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* est estimé à 40 et 18 %, respectivement, soit un risque relatif de l'ordre de 40 et 18, par rapport à la population générale. Les cancers de l'ovaire dus aux mutations constitutionnelles des gènes *BRCA* sont plus agressifs que les cancers de l'ovaire sporadique. Cependant, ils sont plus sensibles que les cancers de l'ovaire sporadiques aux chimiothérapies provoquant des cassures d'ADN double brin, comme les sels de platine.

Autres risques tumoraux associés aux mutations des gènes *BRCA*

Les hommes présentant une mutation de *BRCA1* et surtout de *BRCA2* ont une augmentation de risque de développer des adénocarcinomes prostatiques. Le risque cumulé a été respectivement estimé à 10 et 20 %. Ces cancers de la prostate sont en règle générale agressifs, d'évolution métastatique et surviennent avant 65 ans, soit 10 ans avant la population générale. Les porteurs et porteuses de mutations du gène *BRCA2* ont une augmentation du risque de développer des cancers du pancréas et des mélanomes mais, dans les deux cas, le risque cumulé à 70 ans est inférieur à 10 %.

Prise en charge médicale des familles avec mutation des gènes *BRCA*

Comme le stipulent les recommandations de l'INCa et le présente l'encadré ci-dessous, le suivi d'une femme porteuse d'une mutation d'un gène *BRCA* doit débuter dès 20 ans et est basé sur la palpation des seins et des creux axillaires tous les 6 mois. L'examen d'imagerie de référence chez une patiente présentant une mutation d'un gène *BRCA* est l'IRM mammaire. En effet, si la mammographie est un excellent examen de dépistage du cancer du sein en population générale chez les femmes de plus de 50 ans, cet examen est inadapté à l'imagerie mammaire de la femme jeune dont les seins sont plus denses et la sensibilité de la mammographie chez les porteuses d'une mutation *BRCA* est mauvaise, ne dépassant pas 50 %. De plus, chez les femmes jeunes, cet examen répété de façon annuelle en réalisant plusieurs incidences est dangereux car les niveaux de radiations ionisantes exposent à un risque mutagène. Chez les porteuses d'une mutation d'un gène *BRCA*, la surveillance par IRM doit commencer à partir de 30 ans ou 5 ans avant le cas de cancer du sein le plus précoce dans la famille s'il existe un cas avant 30 ans. L'IRM doit être réalisée à un rythme annuel et être complétée, sur un délai d'un maximum de 2 mois, d'une incidence de mammographie permettant de détecter les micro-calcifications. Il est à noter que la surveillance par IRM génère dans 15 % des cas, dès le premier examen, des faux positifs conduisant à des biopsies. Si l'IRM a représenté une avancée majeure dans la prise en charge des familles avec mutation des gènes *BRCA*, le suivi par IRM de femmes porteuses d'une mutation a malheureusement révélé des cancers du sein survenant entre deux IRM réalisées à un an d'intervalle. Ces cancers dits « de l'intervalle », observés en particulier chez les porteuses d'une mutation *BRCA1*, et la rapidité évolutive des cancers du sein résultant de mutation *BRCA1*, constituent les principaux arguments justifiant de proposer, en particulier aux femmes porteuses d'une mutation du gène *BRCA1*, une mastectomie prophylactique avec conservation ou non de la plaque aréolomamelonnaire et reconstruction simultanée. Afin que la femme puisse mûrir sa réflexion et prendre sa décision en étant parfaitement informée, il est crucial de proposer plusieurs séances d'information auprès d'un chirurgien spécialisé et un accompagnement psychologique et l'indication chirurgicale doit être posée lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) spécialisée. Il est recommandé de réaliser la mastectomie avant 40 ans, période pendant

laquelle le risque de développer un cancer du sein est élevé et l'imagerie mammaire peut être prise en défaut. Aucune étude ne permet actuellement de considérer qu'il existe un âge limite pour cette intervention prophylactique. Chez les hommes porteurs d'une mutation *BRCA*, le risque de développer un cancer du sein reste suffisamment faible pour qu'il soit justifié de ne pas leur proposer un dépistage systématique par imagerie.

Prise en charge des femmes porteuses d'une mutation d'un gène *BRCA*

- À partir de 20 ans, palpation des seins et des creux axillaires tous les 6 mois.
- À partir de 30 ans, ou 5 ans avant le cas de cancer du sein s'il existe un cas avant 30 ans, IRM mammaire annuelle, complétée d'une seule incidence de mammographie.
- Avant 40 ans, en particulier chez les porteuses d'une mutation de *BRCA1*, après information, temps de réflexion et accompagnement psychologique mastectomie prophylactique.
- Après 40 ans et tout projet parental, annexectomie prophylactique.

Concernant le risque de cancers de l'ovaire chez les porteuses d'une mutation *BRCA*, il n'existe à ce jour aucune technique d'imagerie permettant une détection précoce des tumeurs. L'efficacité de l'échographie transvaginale ou transpariétale, chez ces patientes, est nulle. Par conséquent, la seule mesure capable d'éviter le risque de cancers de l'ovaire, dont le diagnostic clinique est en règle générale tardif, est **l'annexectomie complète prophylactique** à réaliser après 40 ans et tout projet parental. Ce geste réalisé par coelioscopie est beaucoup plus simple que la mastectomie prophylactique et la majorité des porteuses de mutation s'orientent facilement vers ce choix prophylactique.

Les nouveaux traitements basés sur les inhibiteurs de PARP

L'avancée la plus importante au cours des deux dernières années dans les cancers du sein et de l'ovaire héréditaires est le développement de thérapies ciblées exploitant l'altération du système de réparation des cassures d'ADN double brin dans ces cancers. Ces thérapies ciblées sont basées sur les inhibiteurs de PARP (*poly(ADP) ribosome polymérase*). L'enzyme PARP-1 joue un rôle clef dans la

réparation des cassures d'ADN simple brin par le système BER (pour *base excision repair*). L'inhibition de PARP empêche la réparation de ces cassures d'ADN simple brin, ce qui entraîne des cassures d'ADN double brin normalement réparées par recombinaison homologue. Si dans la cellule la protéine *BRCA1* ou *BRCA2* est inactivée, cette réparation ne peut avoir lieu et cela active le système NHEJ, ce qui entraîne une instabilité génétique. Les cellules présentant une inactivation complète de la protéine *BRCA1* ou *BRCA2* sont 1 000 fois plus sensibles que les autres cellules aux inhibiteurs de PARP. Les inhibiteurs de PARP provoquent donc une létalité sélective des cellules cancéreuses avec inactivation des protéines *BRCA*, ont une toxicité réduite vis-à-vis des cellules non cancéreuses et sont bien tolérés chez les patientes. Plusieurs essais thérapeutiques ont démontré l'efficacité des inhibiteurs de PARP dans le traitement des cancers du sein et de l'ovaire et ces médicaments ont reçu l'autorisation de mise sur le marché à partir de 2015. Chez une patiente atteinte d'un cancer du sein ou de l'ovaire, l'identification d'une mutation délétère des gènes *BRCA* a donc un double impact : suivi personnalisé de la patiente et de la famille d'une part et thérapie ciblée d'autre part. Ainsi, il est essentiel que la prescription d'une analyse des gènes *BRCA* se fasse en étroite interaction entre oncologues et généticiens afin d'assurer à la fois prise en charge thérapeutique appropriée et suivi codifié de la patiente et de sa famille.

Le cancer colorectal héréditaire

Épidémiologie, déterminisme génétique

Il s'agit, après le cancer du sein et de l'ovaire héréditaire, du second principal motif des consultations d'oncogénétique. Les formes mendéliennes de cancer colorectal héréditaire qui représentent environ 5 % des cancers colorectaux sont le syndrome de Lynch ou cancer colorectal héréditaire non polyposique (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, [HNPCC]), les polyposes adénomateuses et les polyposes hamartomateuses. Quel que soit le déterminisme, héréditaire ou non, tout cancer colorectal résulte de la transformation maligne d'un adénome colorectal.

Le syndrome de Lynch est la forme la plus fréquente de cancer colorectal héréditaire. Le terme « syndrome de Lynch » est aujourd'hui préféré à celui de « syndrome HNPCC » qui suggère, à tort, que le risque tumoral concerne exclusivement le cadre colorectal alors que les principaux risques tumoraux sont **l'adénocarcinome colorectal** et **l'adé-**

nocarcinome de l'endomètre. Le syndrome de Lynch serait à l'origine d'environ 3 % des cancers colorectaux, est la première cause du cancer colorectal du sujet jeune ; sa fréquence est estimée à une personne sur 600.

Les polyposes adénomateuses recto-coliques se définissent par la survenue d'au moins 10 adénomes colorectaux. Les polyposes adénomateuses sont classées, sur le plan génétique, en deux catégories : d'une part **la polypose adénomateuse autosomique dominante** par mutation constitutionnelle hétérozygote du gène *APC*. Ces polyposes sont le plus souvent diffuses et se caractérisent par le développement, dès la puberté, de centaines voire de milliers de polypes adénomateux répartis tout le long du cadre colorectal. Ces adénomes se développent également au niveau du tractus digestif haut à hauteur de la papille duodénale. La pénétrance élevée des mutations du gène *APC* (de l'ordre de 85 %), l'évolution inéluctable de ces adénomes vers un cancer et le nombre des adénomes colorectaux, imposent de réaliser chez les porteurs de mutations du gène *APC* associées à ces formes diffuses **une colectomie prophylactique avec anastomose iléorectale** ou **anastomose iléo-anale** avant l'âge de 15 ans. Par conséquent dans ce type de polypose, le diagnostic pré-symptomatique s'effectue dès l'âge de 11–12 ans ainsi que la surveillance par coloscopie tous les deux ans chez les sujets porteurs. La seconde catégorie est la polypose adénomateuse autosomique récessive par mutation biallélique du gène *MUTYH* intervenant dans le système de réparation BER. Cette polypose est cliniquement atténuée avec un nombre d'adénomes entre 10 et 100, de révélation tardive, souvent après 30 ans, et de présentation parfois sporadique. Chez les sujets porteurs d'une mutation biallélique du gène *MUTYH*, la surveillance est basée sur la chromocoloscopie tous les deux ans à partir de 20 ans.

Les polyposes hamartomateuses, beaucoup plus rares, sont de transmission autosomique dominante et se caractérisent par des polypes hamartomateux résultant d'une anomalie du développement du tissu colorectal et se développant dès l'enfance. Ces lésions sont très caractéristiques sur le plan anatomopathologique et, en règle générale, le diagnostic est posé par le pathologiste. Il s'agit du syndrome de **Peutz-Jeghers**, dû aux mutations du gène *STK11*, de **la polypose juvénile** due aux mutations du gène *SMAD4* ou du gène *BMPR1A* et du syndrome de Cowden dû aux mutations du gène *PTEN*. Dans ces polyposes hamartomateuses, le risque de transformation maligne et de cancer colorectal est plus faible que dans les polyposes adénomateuses. Les principaux risques sur le plan digestif sont des accidents mécaniques dus à la taille des polypes : occlusion intestinale, volvulus du grêle, prolapsus rectal.

Définition nosologique du syndrome de Lynch

Après la description originelle du syndrome dès 1913 par Aldred Scott Warthin puis en 1966 par Henri Lynch, une première définition de ce syndrome fut proposée en 1991 par un consortium international selon des critères dits « d'Amsterdam » :

- trois apparentés atteints de CCR histologiquement prouvés, un des apparentés devant être lié au premier degré avec les deux autres ;
- au moins deux générations successives atteintes ;
- un des cancers diagnostiqué avant l'âge de 50 ans ;
- exclusion de la polypose adénomateuse rectocolique familiale.

En 1999, les critères d'Amsterdam furent révisés pour intégrer le spectre tumoral en fait plus large de ce syndrome, en rappelant que l'autre risque tumoral majeur est chez les femmes le cancer du corps de l'utérus ou celui de l'endomètre. En effet, les patients atteints du syndrome de Lynch ont un risque également plus élevé de développer des tumeurs extra-coliques. Ces tumeurs sont des adénocarcinomes (endomètre, ovaire, estomac, intestin grêle, tractus biliaire) et des tumeurs transitionnelles du tractus urinaire, l'autre risque majeur étant celui du cancer du corps de l'utérus ou adénocarcinome de l'endomètre. Ces critères révisés exigent :

- au moins trois sujets atteints de cancers appartenant au spectre du syndrome de Lynch et histologiquement prouvés ;
- l'un étant lié au premier degré aux deux autres, deux générations successives étant atteintes ;
- un des cancers au moins s'étant révélé avant l'âge de 50 ans.

Actuellement, le syndrome de Lynch est défini par la présence d'une mutation constitutionnelle d'un des gènes du système MMR.

L'altération du système MMR de réparation de l'ADN

Le syndrome de Lynch résulte de la mutation hétérozygote d'un des gènes du système de réparation de l'ADN, le système MMR (pour *mismatch repair system*). Ce système est remarquablement conservé de la bactérie à l'homme et ce fut d'ailleurs l'étude de mutants d'*E. coli* présentant un taux anormalement élevé de mutations qui a permis sa caractérisation dans les années 1983–84 dans les bactéries. Le système MMR répare les mésappariements des bases résultant d'erreurs de la réplication de l'ADN en faisant interve-

nir plusieurs protéines qui, activées de façon séquentielle, agissent en cascade. Dans la bactérie, les protéines du système MMR sont les protéines MutS, MutL et MutH. La protéine MutS reconnaît les bases non ou mal appariées puis la protéine MutL rejoint le complexe MutS-ADN. D'une manière dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et stimulée par MutL, MutS quitte le mésappariement, se transloque le long de l'ADN pour ensuite déclencher l'activité endonucléasique monocaténaire latente de MutH. La protéine MutH coupe alors le brin d'ADN répliqué qui porte la base erronée. Ce brin répliqué peut être effectivement distingué du brin parental car il est transitoirement non méthylé. Les homologues humains impliqués dans le syndrome de Lynch et intervenant dans la correction des mésappariements sont *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* et *PMS2*. Les gènes *MSH2* et *MSH6* sont localisés dans la région chromosomique 2p22-21, ces deux locus étant séparés de 200 kb. Les gènes *MLH1* et *PMS2* sont respectivement localisés en 3p21 et 7p22. Chez l'homme, contrairement à la bactérie, les différentes étapes de la réparation sont assurées par des hétérodimères, reconnaissance des mésappariements par l'hétérodimère *MSH2/MSH6* puis fixation d'un second hétérodimère *MLH1/PMS2*. Comme dans la bactérie, la réparation se poursuivra par des étapes d'excision, de resynthèse et de ligation.

Les gènes les plus fréquemment altérés dans le syndrome de Lynch sont les gènes *MSH2* et *MLH1*. Les mutations de *MSH6* et surtout de *PMS2* sont plus rares. Tous les types d'altérations inactivatrices ont été détectés dans le syndrome de Lynch : mutations non-sens, mutations *frameshift*, mutations faux-sens, mutations d'épissage touchant les sites donneurs et accepteurs d'épissage, remaniements génomiques et méthylations constitutionnelles. Un type très particulier d'altération constitutionnelle a été décrit dans le syndrome de Lynch : il s'agit de délétions génomiques constitutionnelles emportant le dernier exon et le signal d'arrêt de transcription du gène *EPCAM/TASCD1* situé juste en amont de *MSH2*. Cette délétion provoque une invasion du locus *MSH2* par un transcrit *EPCAM*, ce qui induit dans l'épithélium colique, une méthylation réactionnelle somatique et donc une répression de l'expression de *MSH2*.

De la mutation constitutionnelle d'un gène MMR à l'instabilité microsatellitaire au phénotype RER et du phénotype RER au cancer

Pour qu'une tumeur se développe chez un sujet porteur d'une mutation constitutionnelle hétérozygote d'un gène

MMR, il semble que l'inactivation de l'autre allèle parental soit nécessaire, l'inactivation des gènes MMR répondant ainsi au modèle de Knudson et Comings initialement élaboré pour les gènes suppresseurs de tumeurs (figure 23.2). Cette altération somatique du second allèle d'un gène MMR peut résulter d'une délétion, d'une mutation ponctuelle ou d'une modification épigénétique, telle l'hyperméthylation des régions promotrices éteignant la transcription. Lorsque les deux allèles d'un des gènes MMR seront inactivés dans une future cellule tumorale, les erreurs de réplication survenant inéluctablement à chaque mitose ne seront plus réparées, ce qui conduira à une forme très particulière d'instabilité génétique touchant préférentiellement les séquences répétées. En effet, les répétitions de nucléotides ou de dinucléotides représentent des points chauds d'erreurs de réplication car l'ADN polymérase a tendance à glisser sur de telles séquences. Cette instabilité génétique, résultant de l'altération du système MMR, est désignée «phénotype RER (*replication error positive*)» ou instabilité microsatellitaire ou MIN (*microsatellite instability*) puisqu'il est possible de la mettre en évidence en amplifiant à partir de l'ADN tumoral des séquences répétées polymorphiques telles les microsatellites ou des séquences mononucléotidiques quasi monomorphiques. La recherche d'un phénotype RER est réalisée en routine dans les plateformes hospitalières de génétique somatique sous l'égide de l'INCa à partir des biopsies ou des blocs tumoraux congelés ou conservés en paraffine, et doit être systématiquement effectuée sur tout cancer colorectal survenant avant 65 ans.

Le phénotype RER conduit à l'apparition de mutations somatiques au niveau de séquences répétées, sites à haut risque d'erreurs de réplication. De telles mutations somatiques touchant des gènes peuvent être oncogéniques et de nombreux gènes cibles de l'instabilité somatique résultant de l'inactivation du système MMR, et dont l'altération est probablement à l'origine de la transformation maligne dans le syndrome de Lynch, ont été identifiés. Ces gènes contiennent dans leur cadre de lecture des séquences répétées mononucléotidiques et sont donc particulièrement sensibles aux erreurs de réplication de l'ADN : l'exemple canonique est le gène du **récepteur de type II du TGFβ**, qui permet normalement la transmission d'un signal inhibiteur de la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium colique et qui contient dans sa région codante une séquence répétée de dix résidus adénine. La délétion ou l'insertion d'une ou de deux adénines, résultant d'une inactivation du système de réparation, conduit à l'absence de ce récepteur. Ces mutations somatiques résultant du phénotype RER et cassant le cadre de lecture ont été identifiées dans de nombreux gènes contenant dans leur cadre de lecture des répétitions de A, G, C ou T et intervenant dans la régulation

de la transduction du signal et du cycle cellulaire, de l'apoptose et la réparation de l'ADN. Le fait d'observer systématiquement dans les CCR de phénotype RER+ plusieurs mutations somatiques de gènes cibles contenant des séquences répétées suggère que l'addition de plusieurs mutations somatiques est nécessaire à la transformation maligne, ce qui explique probablement pourquoi la mutation constitutionnelle d'un seul de ces gènes cibles ne peut à elle seule être responsable d'un syndrome de Lynch et très probablement pourquoi la pénétrance des mutations constitutionnelles des gènes MMR est incomplète (figure 23.3).

Si le phénotype RER+ est associé au syndrome de Lynch, il n'est pas spécifique à ce syndrome et n'implique pas obligatoirement l'existence d'une mutation constitutionnelle d'un gène MMR. En effet le phénotype RER+ traduit l'inactivation complète du système MMR dans une tumeur, mais cette inactivation peut résulter de l'inactivation somatique des 2 allèles. Ainsi, environ 12–15 % des cancers colorectaux (non sélectionnés sur la base des antécédents familiaux) présentent un phénotype RER+. Les mutations constitutionnelles des gènes MMR ne sont identifiées que dans 15 % de ces cancers de phénotype RER+. Dans la majorité des cas, le phénotype RER+ résulte d'altérations purement somatiques des gènes MMR, telles des mutations bi-alléliques, ou le plus souvent de **l'hyperméthylation biallélique somatique** du promoteur du gène *MLH1* qui, alors, n'est plus exprimé, cette altération épigénétique des îlots CpG définissant alors le phénotype *CpG island methylator* (CIMP) et étant une des principales causes du cancer de la personne âgée de plus de 70 ans. Ces CCR de phénotype RER+, par hyperméthylation biallélique de *MLH1*, présentent une extinction de l'hétérodimère MLH1-PMS2 en immunohistochimie et, fréquemment mais non systématiquement, la mutation p.V600E du gène *BRAF*, alors que cette mutation est exceptionnellement retrouvée dans les CCR s'intégrant à un syndrome de Lynch. Ainsi, un phénotype RER+ dans un CCR doit être toujours interprété en fonction de l'âge de survenue du cancer et l'existence ou non d'antécédents familiaux évocateurs d'un syndrome de Lynch.

Caractéristiques des tumeurs colorectales dans le syndrome de Lynch

Les cancers du côlon et du rectum rencontrés dans le syndrome de Lynch surviennent chez l'adulte jeune, en moyenne à 44 ans et, dans 5 % des cas, avant l'âge de 25 ans. Les tumeurs sont localisées au niveau du côlon proximal,

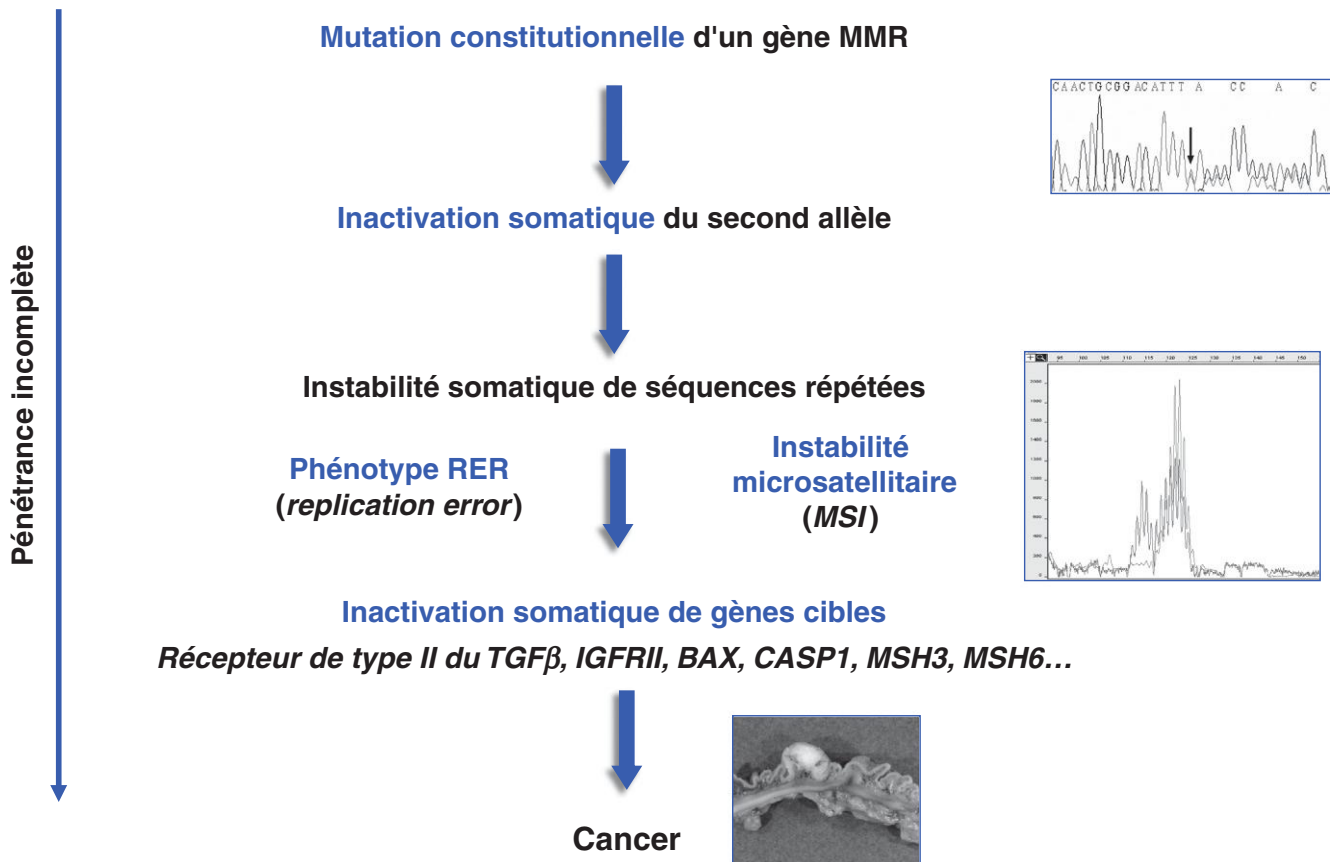


Figure 23.3

Histoire naturelle du syndrome de Lynch.

c'est-à-dire du côlon droit, dans 70 % des cas, ce qui est l'inverse de cancers colorectaux sporadiques. Sur le plan histologique, ces tumeurs sont souvent peu différenciées et présentent une réaction lymphoïde qualifiée de *Crohn's-like*. Bien que le syndrome de Lynch ne soit pas associé à une polyposé, les cancers colorectaux se développant dans ce syndrome sont néanmoins le résultat de la dégénérescence de polypes adénomateux. Plus d'un tiers des sujets atteints de syndrome de Lynch présente d'ailleurs des adénomes coliques, mais en nombre limité (< 10). Les adénomes détectés sont généralement de grande taille (> 1 cm), de nature villosité et ont une évolution plus agressive. Les cancers colorectaux s'intégrant au syndrome de Lynch ont un meilleur pronostic que les CCR sporadiques. Le risque cumulé à 70 ans de développer un cancer colorectal, chez un porteur de la mutation d'un gène MMR, est estimé à 60 % chez les hommes et à 40 % chez les femmes. Le risque de développer un second cancer colorectal chez les patients atteints d'un premier cancer colorectal et opérés d'une colectomie segmentaire a été estimé à 15 % à 10 ans et 55 % à 20 ans.

Caractéristiques des cancers de l'endomètre dans le syndrome de Lynch

L'âge moyen au diagnostic de l'adénocarcinome de l'endomètre s'intégrant au syndrome de Lynch est de 48 ans soit 15 ans plus tôt que dans la population générale. Dans environ un quart des cas, le cancer de l'endomètre est la première manifestation tumorale chez les femmes atteintes. Le risque de cancer de l'endomètre chez les femmes porteuses d'une mutation a été estimé à 30–40 %.

Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch

En pratique médicale, le diagnostic de syndrome de Lynch doit être envisagé devant les situations suivantes :

- au moins deux sujets liés au premier degré sur deux générations présentant un cancer appartenant au spectre tumoral du syndrome de Lynch, l'un des cancers diagnostiqués avant l'âge de 51 ans ;

- ou des cancers primitifs multiples appartenant au spectre tumoral, dont le premier s'est révélé avant 51 ans;
- ou un CRC de phénotype RER+ chez un patient de moins de 61 ans.

De telles familles doivent bénéficier d'une consultation d'oncogénétique dont l'objectif sera de valider, après obtention des dossiers médicaux du cas index et des apparentés atteints, la pertinence de cette hypothèse diagnostique. Puisqu'il existe dans le syndrome de Lynch une véritable signature moléculaire correspondant au phénotype RER, il est essentiel, afin d'éviter d'inutiles analyses génétiques complexes et coûteuses, de confirmer dans un premier temps le diagnostic du syndrome de Lynch par la mise en évidence d'un phénotype RER à partir des tumeurs, en particulier colorectales. Le marquage immunohistochimique des tumeurs avec des anticorps dirigés contre les quatre protéines MMR MSH2, MSH6, MLH1 et PMS2 a un double intérêt : confirmer le résultat de la recherche du phénotype RER et cibler l'altération génétique constitutionnelle. En effet, la plupart des mutations constitutionnelles des gènes MMR conduisent à une

extinction de la protéine correspondante ou de l'hétérodimère, puisque les quatre protéines agissent sous forme d'hétérodimère MSH2-MSH6 et MLH1-PMS2.

Une fois que les analyses somatiques auront permis de confirmer le diagnostic de syndrome de Lynch, il sera alors possible de rechercher une altération constitutionnelle d'un des gènes MMR à partir d'une prise de sang, à l'issue de la consultation d'oncogénétique du cas index. La mise en évidence d'une altération constitutionnelle d'un gène MMR sera à la fois essentielle à la prise en charge du cas index et de ses apparentés puisqu'elle permettra de leur proposer une analyse présymptomatique : il sera possible, chez les sujets non porteurs de la mutation identifiée dans leur famille, de lever une inquiétude illégitime et une surveillance médicale inappropriée et, chez les sujets porteurs, d'assurer un dépistage des tumeurs selon les recommandations nationales. La [figure 23.4](#) présente la stratégie du diagnostic d'une forme héréditaire de cancer colorectal dès lors que la présentation clinique est évocatrice. En pratique, les éléments essentiels sont l'analyse du nombre d'adénomes et les analyses somatiques de la tumeur.

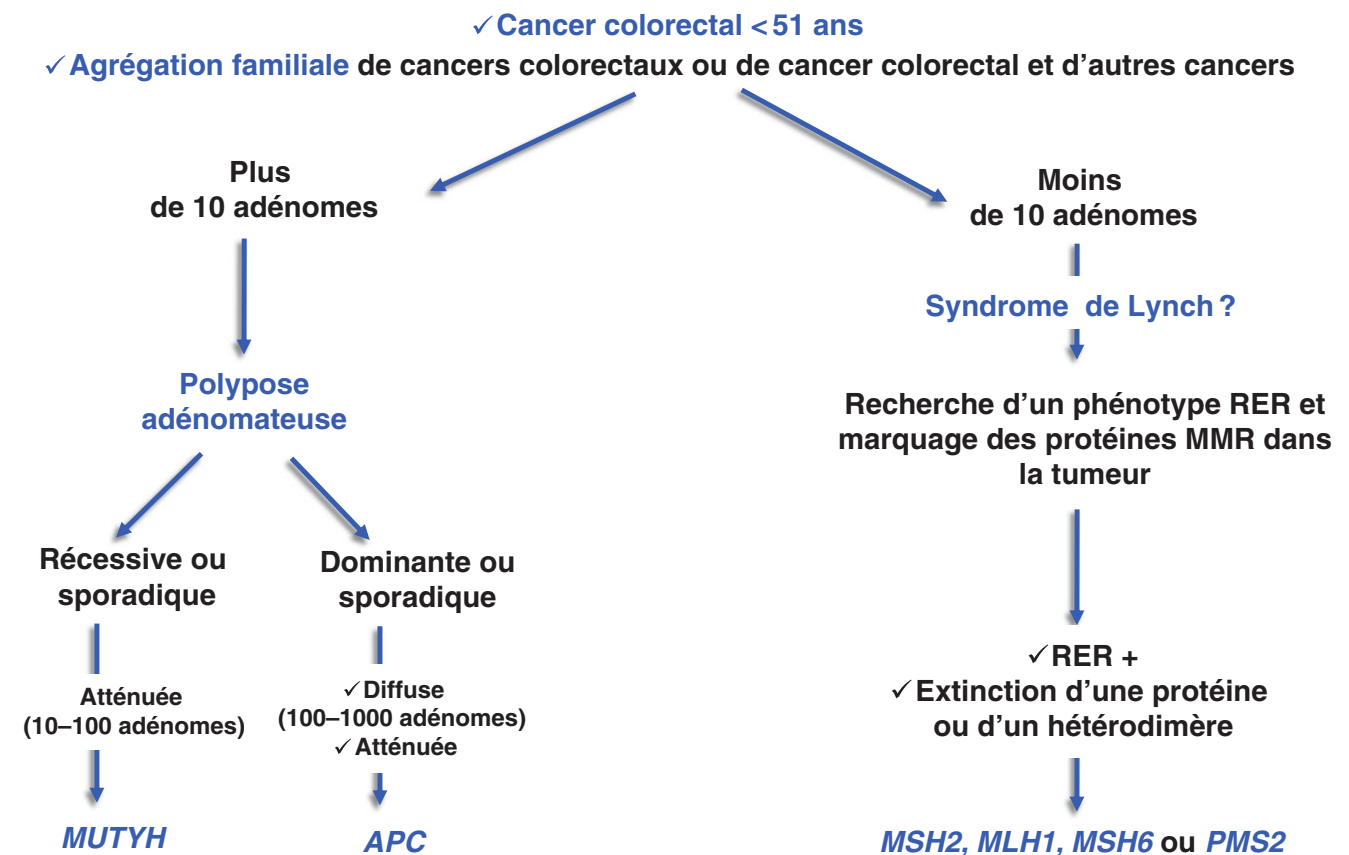


Figure 23.4

Stratégie diagnostique des formes héréditaires de cancer colorectal.

Les polyposes hamartomateuses plus rares ne sont pas mentionnées car leur présentation anatomopathologique typique permet le plus souvent d'en faire aisément le diagnostic.

Prise en charge médicale des patients porteurs d'une altération constitutionnelle d'un gène MMR

Chez les patients porteurs d'une altération constitutionnelle d'un gène MMR, le dépistage des tumeurs colorectales s'effectue par endoscopie colorectale complète avec coloration à l'indigo-carmin qui permet de faciliter la détection des petits adénomes et des adénomes plans (voir encadré ci-dessous). Cette chromocoloscopie doit débuter dès 20 ans, être réalisée tous les deux ans, en insistant sur l'importance d'un lavement de qualité pour que l'ensemble du cadre colorectal jusqu'à la valvule de Bauhin puisse être visualisé. Contrairement à la polypose adénomateuse diffuse, la colectomie prophylactique n'est pas recommandée, compte tenu de l'efficacité démontrée de la surveillance par chromocoloscopie dès lors qu'elle est effectuée tous les deux ans.

Prise en charge des porteurs et porteuses d'une mutation d'un gène MMR

- À partir de 20 ans, chromocoloscopie complète tous les deux ans.
- À partir de 30 ans, échographie endovaginale avec prélèvement endométrial par Pipelle de Cornier tous les deux ans.
- Après 40 ans et accomplissement du projet parental, hystérectomie avec ovariectomie prophylactique.

Chez les femmes porteuses d'une mutation, il est également recommandé de réaliser à partir de 30 ans, tous les deux ans, un dépistage des adénocarcinomes de l'utérus par **échographie endovaginale** avec **prélèvement endométrial** par Pipelle de Cornier. **L'hystérectomie avec ovariectomie prophylactique** doit être proposée aux femmes porteuses d'une mutation d'un gène MMR après 40 ans et accomplissement du projet parental. La surveillance systématique des autres organes n'est pas recommandée, compte tenu du risque beaucoup plus faible de survenue des autres tumeurs. En revanche devant tout signe d'appel clinique, il conviendra de déclencher les investigations complémentaires.

Bibliographie

- Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature* 2014; 505(7483); 302–8.
- Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes; American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer; European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 2015; 33(2); 209–17.

ENTRAÎNEMENT 22 QCM-QCS

QCM 1

Quelle(s) est/sont la/les proposition(s) exacte(s) concernant les bases moléculaires du cancer ?

- A. La transformation maligne résulte de mutations inactivatrices de proto-oncogènes
- B. La majorité des mutations identifiées dans les cancers ont un rôle causal dans la transformation maligne
- C. L'inactivation de gènes de réparation de l'ADN joue un rôle clé dans la transformation maligne
- D. Les proto-oncogènes contrôlent la transduction du signal
- E. La transformation maligne résulte à la fois de mutations activatrices et de mutations inactivatrices

QCM 2

Quell(e) est/sont la/les proposition(s) exacte(s) concernant les bases moléculaires du cancer ?

- A. Les mutations à l'origine de la transformation maligne provoquent directement ou indirectement une instabilité génétique
- B. La majorité des cancers résultent de l'accumulation séquentielle de mutations somatiques
- C. Les cancers héréditaires sont exceptionnels
- D. Un cancer héréditaire est dû à une mutation constitutionnelle présente dans toutes les cellules de l'organisme
- E. Les cancers héréditaires ont le plus souvent une transmission autosomique dominante avec pénétrance incomplète

QCM 3

Chez un patient présentant un cancer, quel est ou quels sont les éléments orientant vers une forme héréditaire ?

- A. Des antécédents de cancers dans les deux branches parentales, quel que soit l'âge

- B.** Le développement de cancers primitifs multiples, le premier survenu à 45 ans
- C.** Le développement de cancers primitifs multiples, le premier survenu à 65 ans
- D.** L'évolution métastatique
- E.** La survenue précoce à 25 ans

QCM 4

Chez une patiente présentant un cancer du sein diagnostiqué à 43 ans, quelle(s) est/sont la/les proposition(s) évocatrices d'une mutation constitutionnelle d'un gène *BRCA* ?

- A.** L'antécédent de cancer du sein chez sa mère à 70 ans
- B.** L'antécédent de cancer du sein chez sa tante paternelle à 38 ans
- C.** L'antécédent de cancer de l'utérus chez sa grand-mère maternelle à l'âge de 65 ans
- D.** L'antécédent de cancer de l'ovaire à 56 ans chez sa grand-mère paternelle
- E.** L'antécédent de cancer de la prostate à 52 ans chez son oncle paternel

QCM 5

Quelle(s) est/sont la/les caractéristique(s) des cancers du sein associés aux mutations du gène *BRCA1* ?

- A.** La rapidité évolutive
- B.** Le profil triple négatif vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes à la progestérone et de l'amplification d'*ERBB2*
- C.** Une sensibilité particulière aux inhibiteurs de PARP
- D.** Leur présentation multifocale
- E.** Leur bon pronostic

QCM 6

Chez une jeune femme de 24 ans porteuse d'une mutation *BRCA1* et dont la mère est décédée à 40 ans d'un cancer du sein, quelle/quelles est/sont les proposition(s) exacte(s) ?

- A.** L'examen clinique des seins doit être réalisé tous les 6 mois à partir de 30 ans

- B.** L'examen clinique des seins doit être réalisé tous les 6 mois à partir de 20 ans
- C.** La surveillance radiologique est basée essentiellement sur la mammographie annuelle à partir de 30 ans
- D.** La surveillance radiologique est basée essentiellement sur l'IRM mammaire annuelle à partir de 30 ans
- E.** La mastectomie prophylactique avant 40 ans est préconisée

QCM 7

Quelle(s) est/sont la/les proposition(s) exacte(s) concernant le syndrome de Lynch ?

- A.** Le syndrome de Lynch représente la plus fréquente des formes héréditaires de cancer du sein
- B.** Le syndrome de Lynch représente la plus fréquente des formes héréditaires de cancer du côlon
- C.** Dans le syndrome de Lynch, un des principaux risques tumoraux est le cancer du col de l'utérus
- D.** Chez un porteur de mutation du gène *MSH2* la coloscopie doit être réalisée à partir de 30 ans tous les cinq ans
- E.** Chez un porteur de mutation du gène *MLH1* la coloscopie doit être réalisée à partir de 20 ans tous les deux ans

QCS 1

Vous voyez en consultation un patient de 28 ans atteint d'un cancer du côlon. La coloscopie mentionne l'existence également de quatre adénomes. Il n'existe pas d'autres cas de cancers du côlon dans sa famille. Vous envisagez :

- A.** Une polypose autosomique dominante par mutation du gène *APC*
- B.** Une polypose autosomique récessive par mutation du gène *MUTYH*
- C.** Un syndrome de Lynch et vous prescrivez une analyse des gènes *MMR* à partir de la tumeur
- D.** Un syndrome de Lynch et vous prescrivez une analyse des gènes *MMR* à partir d'une prise de sang
- E.** Un syndrome de Lynch et vous prescrivez une analyse des gènes *MMR* à partir d'une prise de sang s'il existe un phénotype RER dans la tumeur

This page intentionally left blank

Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique

Christophe Bérout, David Salgado

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	264
Les bases de données	264
Outils bioinformatiques utiles en génétique	267
Conclusion	270



Points essentiels

- principales ressources bioinformatiques facilitant l'identification de mutations pathogènes;
- illustration des étapes clé de l'analyse d'une séquence avec la liste des ressources clé pour chacune d'entre elles.

Introduction

Les bases de données et les outils bioinformatiques utiles en génétique sont aujourd'hui si divers et complexes que leur traitement exhaustif nécessiterait un livre entier. Ainsi, dans ce chapitre, nous avons pris le parti de limiter le traitement de ce sujet et pour cela de l'aborder *via* le prisme d'un laboratoire de génétique moléculaire. Ceci nous permettra de naviguer des aspects de génomique vers ceux des phénotypes en proposant des listes choisies des meilleures ressources, tant en matière de bases de données que de logiciels accessibles en ligne.

Pour bien comprendre la situation actuelle, il est utile de se replonger quelques années en arrière, dans les années 1980. C'est en effet vers cette époque que diverses initiatives internationales furent prises afin de colliger les données disponibles pour les rendre accessibles au plus grand nombre. Deux visions ont alors vu le jour : la première avait pour objet de développer des ressources spécialisées tandis que la seconde, beaucoup plus ambitieuse, souhaitait collecter l'ensemble des données et les stocker au sein d'une ressource unique. Ces deux approches sont toujours d'actualité et possèdent des avantages et des inconvénients. Ainsi, l'approche spécialisée permet à des experts de valider les données avant leur inclusion. Cette validation est souvent regroupée sous le terme anglo-saxon de *curation*. Elle possède l'avantage d'assurer une qualité optimale des données mais nécessite un grand nombre d'experts et est peu compatible avec une vision exhaustive compte tenu de l'explosion des connaissances, sur laquelle nous reviendrons. À l'autre bout du spectre, les bases centralisées ne permettent plus d'assurer une validation manuelle et perdent ainsi en qualité mais peuvent intégrer un nombre considérable de données et bénéficier des avancées dans le domaine du *data mining* (extraction automatisée de données). Néanmoins, même si les capacités de stockage sont immenses, la vision d'un système unique se heurte souvent à des problèmes de stratégie, de développement, de maintenance et de choix politiques comme l'a illustré le cas de la *GDB Human Genome Database*. Celle-ci vit le jour en

1989 sous l'égide du Howard Hughes Medical Institute qui souhaitait créer une base centrale de données génétiques, principalement de cartographie à cette époque. Le développement du projet de séquençage du génome humain fit perdre de l'intérêt à ce système qui tenta en vain de s'adapter mais disparu en 2008. Comme souvent, le modèle idéal n'existe pas et diverses solutions intermédiaires sont aujourd'hui proposées. La première consiste à créer des systèmes interconnectés (portails) qui sont capables d'aller chercher l'information dans différentes bases de données, d'assembler ces données et d'en faire la synthèse qui est alors proposée à l'utilisateur final. Cette approche permet en théorie de garantir aux fournisseurs initiaux des bases de données spécialisées, par exemple, le respect de la propriété intellectuelle sur ces données, de s'affranchir des problèmes de mises à jour des données et des problèmes éthiques, la plupart étant traités au niveau des bases de données distantes. Ces avantages peuvent aussi être vus comme des défauts puisqu'ils ont une grande dépendance vis-à-vis des fournisseurs de données : *quid* si l'un d'eux ferme ? Comment traiter les mises à jour asynchrones entre les différents fournisseurs : données utilisant des systèmes de référence différents ? Comment assurer le respect des consentements dans le cadre d'une utilisation secondaire des données ?

La seconde approche consiste à bénéficier de la puissance des réseaux sociaux *via* le *crowd computing* (informatique de foule) et le *crowd sourcing* (approvisionnement par la foule). Ces approches tirent profit de la capacité de divers groupes à s'unir soit pour partager des ressources de calcul (des millions d'ordinateurs individuels travaillent de concert) soit à travailler en commun (des millions d'individus peuvent extraire du savoir de la littérature avec un apport individuel limité).

Ces diverses initiatives ont toutes un but commun qui est de structurer les données liées à la génétique afin de les rendre facilement utilisables pour l'ensemble des professionnels, qu'ils soient généticiens moléculaires ou cliniciens, chercheurs, industriels, etc.

Les bases de données

Bases de données de séquences

Le séquençage du génome humain a été réalisé par un consortium international et a abouti à la création de la séquence de référence du génome humain en 2001.

Cette séquence est périodiquement mise à jour et annotée par trois acteurs majeurs : Ensembl (www.ensembl.org) au niveau européen, le National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) et la University of California Santa Cruz (UCSC, <http://genome.ucsc.edu>) au niveau américain. Ces mises à jour varient dans leur fréquence et leur contenu. Les mises à jour majeures (GRCh37 de 2010, GRCh38 de 2014) apportent des modifications dans la séquence de référence elle-même tandis que les mises à jour mineures (GRCh37.p2 à x pour *patched*) apportent surtout des modifications au niveau de l'annotation de cette séquence : nouveaux gènes et transcrits. L'énorme travail d'annotation du génome humain est réalisé soit manuellement soit *via* des algorithmes spécialisés afin de prédire la présence de gènes, de transcrits, d'exons et d'introns, de sites de fixation de différents facteurs, de sites sensibles à la DNaseI, de motifs histones présents dans les régions promotrices actives (marques H3K27ac – acétylation du résidu lysine en position 27 de la sous-unité histone 3, et H3K4me3 – méthylation du résidu lysine en position 4 de la sous-unité histone 3), de variations connues, de séquences répétées telles que les éléments *LINE* (pour *long interspersed nuclear element*), *SINE* (pour *short interspersed nuclear element*), LTR (pour *long terminal repeat*), etc. Parallèlement, ces trois bases de données sont accessibles *via* des navigateurs qui permettent de comparer le génome humain à celui d'une centaine d'autres espèces et ainsi de définir la conservation de chaque nucléotide au cours de l'évolution. Bien qu'ils partagent la même séquence de référence, ces bases de données diffèrent au niveau de l'annotation, notamment au niveau des différents transcrits d'un même gène. Afin de s'assurer que les informations obtenues puissent être comparées, il existe des informations croisées permettant de passer d'un outil à l'autre. Parallèlement, il peut être nécessaire d'accéder à d'autres bases de données dédiées à la séquence des gènes humains telles que la base de données des séquences codantes consensus ou CCDS (www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi), ou à celle des loci génomiques de référence ou LRG (pour *locus génomique reference*) (www.lrg-sequence.org). Cette dernière a pour objectif de fournir des séquences de référence stables au cours du temps, c'est-à-dire indépendantes des mises à jour de la séquence du génome humain.

Bases de données de variants

Après avoir identifié le gène siège d'une mutation, il est souvent nécessaire de pouvoir collecter des informations

relatives à cette variation afin de pouvoir en apprécier son caractère pathogène. Pour cela, l'utilisateur pourra avoir recours à différents niveaux d'information : au niveau de populations, de maladies ou de gènes. Il est important que l'utilisateur connaisse les avantages et les limites de ces différentes bases de données qui lui fourniront des informations complémentaires dont la qualité diffère afin de pouvoir interpréter au mieux l'ensemble des informations collectées.

Bases de données spécifiques de populations

Comme cela est maintenant bien documenté, la fréquence des variations du génome humain varie en fonction des populations analysées. Il est ainsi important de pouvoir comparer les résultats obtenus pour un individu donné à ceux d'une population de référence appariée. Pour cela, différentes bases de données ont été créées et sont accessibles *via* Internet. Nous pouvons ainsi citer les bases de données :

- **dbSNP** (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). Il est important de noter que cette base de données originellement dédiée aux *single-nucleotide polymorphisms* (SNP) a maintenant évolué et contient des données relatives aux *short genetic variations* (SGV). Ceci ne va pas sans conséquences puisque les étapes de filtration proposent souvent d'exclure les variants déjà rapportés dans dbSNP. Il convient donc de les utiliser avec discernement et nous recommandons en pratique de n'exclure que les variants décrits avec une fréquence importante. Outre le détail de chaque variant, des informations relatives à sa fréquence dans différentes populations sont disponibles ;
- **ALFRED** (*Allele Frequency Database* : <http://alfred.med.yale.edu>). Cette ressource fournit des informations relatives à la fréquence de variations dans différentes populations humaines. Cette ressource est beaucoup plus riche que la précédente et permet des recherches à partir de 126 populations et régions géographiques ;
- **dbVar** (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar). Cette base de données est dédiée à la collection des grands réarrangements, c'est-à-dire aux variations structurales impliquant des délétions, insertions, duplications, inversions, délétions-insertions, insertions d'éléments mobiles, translocations et des réarrangements complexes. Comme pour la base dbSNP, des informations relatives à la fréquence de ces variations dans différentes populations sont disponibles.

Bases de données spécifiques de maladies

Si la connaissance de la fréquence d'une variation dans une population est une information capitale pour évaluer sa pathogénicité potentielle, un autre élément clé est celui de la démonstration d'une relation de cause à effet entre la présence de cette mutation et un phénotype particulier. Deux types de ressources permettent d'accéder à ce niveau d'information : les bases de données spécifiques de maladies et les bases de données spécifiques de gènes. Les premières sont des ressources extrêmement précieuses et dédiées à une maladie donnée ou un groupe de maladies. Nous pouvons ainsi citer :

- la base de données de référence des maladies génétiques **OMIM** (*Online Mendelian Inheritance in Man* : www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) qui compile les gènes humains et les phénotypes associés;
- **Diseasecard** (<http://bioinformatics.ua.pt/diseasecard>) qui permet d'accéder à de très nombreuses informations associées aux maladies rares. Il s'agit d'une ressource très complète qu'il est utile de connaître;
- le registre international de la maladie de **Werner** (www.wernersyndrome.org) qui contient des informations relatives aux critères de diagnostic de cette maladie, des informations utiles aux patients et aux chercheurs. Il existe également un lien vers une base de données spécifique du gène WRN;
- le registre international des **maladies héréditaires auto-immunes** (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers>). Ce dernier permet d'accéder à des informations spécifiques sur ces pathologies, sur les conférences internationales qui leur sont dédiées, les laboratoires en assurant le diagnostic dans le monde et bien sûr sur les mutations identifiées dans les différents gènes responsables de ces pathologies (25 gènes à ce jour);
- les registres dédiés aux maladies de **Parkinson** (www.pdgene.org), aux **schizophrénies** (www.szgene.org) et à la maladie **d'Alzheimer** (www.alzgene.org). Contrairement aux registres précédents, ces bases de données sont dédiées à des maladies génétiques dites complexes, c'est-à-dire pour lesquelles plusieurs gènes sont impliqués avec vraisemblablement un faible rôle pour chacun. Dans ces conditions, peu de gènes ont encore été clairement identifiés et ce sont surtout les études d'association (GWAS, pour *Genome Wide Association Studies*) qui ont permis d'identifier des loci candidats. L'utilisateur accède ainsi à l'ensemble

des données et peut naviguer vers les bases de données génomiques (voir ci-dessus « Bases de données de séquences ») *via* une interface conviviale.

Quel que soit leur objectif, de plus en plus de registres internationaux sont disponibles pour des pathologies ou groupes de pathologies. Ils permettent maintenant de réunir tous les acteurs, que ce soit les patients, les généticiens, les cliniciens, les chercheurs et les industriels, autour d'une base de données unique facilitant ainsi la recherche, le diagnostic et le développement de nouvelles thérapies comme l'illustre le réseau TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu). Leur accès, compte tenu des contraintes éthiques et légales, peut cependant être restreint et nécessiter un enregistrement préalable. De plus amples informations peuvent être obtenues *via* la Human Genome Variation Society (HGVS, www.hgvs.org).

Bases de données spécifiques de gènes

Parallèlement aux bases dédiées à des maladies, ont été développées des bases de données dites locus-spécifiques ou LSDB (*Locus Specific Databases*). Leur point d'entrée n'est plus le patient ou la maladie mais le gène. Ainsi ne sont disponibles que des mutations, pathogènes ou non, pour un gène donné. Ces ressources sont souvent considérées comme celles contenant les données de meilleure qualité puisque l'ensemble des données est vérifié et validé par des experts. Ces données moléculaires ont été progressivement enrichies par des données phénotypiques. Comme vous l'avez compris, il existe maintenant un continuum entre les LSDB purement moléculaires et les bases de données spécifiques de maladies. Les LSDB les plus complètes portent ainsi maintenant le nom de « bases de connaissance » (*knowledge base*) puisqu'elles disposent d'algorithmes complexes et permettent d'extraire un véritable savoir à partir des données et non pas seulement de disposer d'outils de recherche simples. Leur archétype est le système UMD (*Universal Mutation Database* : www.umd.be) qui est développé en France. Il est difficile d'extraire quelques exemples compte tenu du nombre important de bases disponibles ; nous retiendrons cependant :

- LSDB TREAT-NMD dédiée au gène DMD (www.umd.be/TREAT_DMD). Cette LSDB est l'agrégation de plus d'une quarantaine de LSDB nationales dédiées aux mutations du gène DMD impliqué dans les maladies de Duchenne et Becker. Il s'agit de l'un des

premiers exemples de véritable collaboration internationale qui a permis d'accélérer le développement de nouvelles thérapies pour la maladie de Duchenne, notamment *via* le saut d'exon thérapeutique (voir [chapitre 25](#), « [Perspectives thérapeutiques en Génétique Médicale](#) »);

- LSDB dédiées aux gènes MMR (www.umd.be/MLH1/, MLH2, MSH6, MYH, APC). Toutes ces bases sont dédiées aux mutations des gènes dits MMR pour *mismatch repair* qui sont impliqués dans différents cancers, notamment digestifs. Ces bases sont un exemple pour la cooccurrence des mutations puisqu'elles permettent d'avoir une vision de l'ensemble des variations décrites chez un même individu. Ceci est très utile pour évaluer la pathogénicité d'une nouvelle mutation faux-sens par exemple;
- les bases de données LOVD (*Leiden Open Variation Database* : www.lovd.nl/3.0/home) sont développées à l'aide d'un système *open-source* simple et ne disposent pas d'algorithmes complexes d'analyse. Il a cependant été utilisé pour créer de très nombreuses bases qui ont été alimentées à l'aide de bases externes. L'enjeu est maintenant d'identifier des curateurs pour en assurer la qualité;
- de très nombreuses autres LSDB sont disponibles. Une liste non exhaustive est disponible sur le site de la Human Genome Variation Society (HGVS : www.hgvs.org/locus-specific-mutation-databases).

Enfin, il est parfois utile d'accéder à des informations relatives à un gène donné même si ce dernier ne dispose pas encore d'une LSDB dédiée. Deux approches sont disponibles. La première est d'accéder au site de la HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee* : www.genenames.org) qui est l'organisme officiel d'attribution des symboles de gènes et met à disposition des fonctions de recherche et téléchargement d'informations relatives aux différents gènes (symbole, description, position chromosomique, synonymes, anciens symboles). La seconde est d'accéder à des bases centrales ou *core databases* telles que HGMD® (pour *Human Gene Mutation Database* : www.hgmd.cf.ac.uk/ac) qui collige l'ensemble des variations du génome humain à partir de la littérature. Ce processus est mixte : extraction automatique d'informations à partir des données bibliographiques (*text mining*) et manuelle (validation de certaines informations par des annotateurs : *biocuration*). Si cette base contient des données pour virtuellement tous les gènes, ces données sont limitées en nombre (seule la première publication d'une

mutation donnée est mentionnée) et en qualité (très peu d'annotations relatives au phénotype associé à une mutation, absence de validation par des experts).

Outils bioinformatiques utiles en génétique

Si les bases de données décrites précédemment contiennent un grand nombre d'informations, celles-ci sont souvent dispersées et somme toute encore limitées. Ainsi, pour répondre à des problématiques très précises elles sont encore insuffisantes et différents outils ont dû être développés pour analyser les séquences produites à la fois par la technologie de référence qu'est le séquençage dit « de Sanger » ou par les technologies à très haut débit ou NGS (*next-generation sequencing*, voir [chapitre 11](#), « [Le séquençage de nouvelle génération](#) »). Dans cette partie nous décrirons les outils disponibles à chaque étape du processus de traitement de l'information.

Séquençage Sanger

Nous ne reviendrons pas ici sur la technique de séquençage Sanger décrite dans le chapitre 10, « Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène ». Nous nous concentrerons uniquement sur les outils d'analyse des données. Le principe de ces outils est de transformer un signal (intensité de fluorescence de chaque base) en un tracé électrophorétique qui permet à l'œil humain de visualiser la séquence). Différents problèmes techniques sont ici à prendre en compte, comme l'homogénéisation des écarts entre bases, le décalage d'une base par rapport aux autres, la détermination de la qualité des signaux obtenus, etc. De nombreux outils sont disponibles. Ils se différencient par leur capacité à gérer des projets, des alignements multiples, leur interface utilisateur et les algorithmes d'alignement et de détection des variants. Les plus connus sont les suites commerciales comme SeqScape® (www.lifetechnologies.com), Sequencher® (www.genecodes.com) et Gensearch® (www.phenosystems.com/www/index.php/products/gensearch) mais d'autres produits gratuits sont également disponibles comme 4peaks (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ou SeqTrace

(<https://code.google.com/p/seqtrace>). À l'issue de l'analyse, l'utilisateur dispose d'une liste de variants avec, dans le meilleur des cas, leur nomenclature officielle.

Séquençage NGS

Avec les technologies de séquençage à très haut débit, le mode de présentation et d'analyse des données a subi une véritable révolution. Il n'est ainsi plus possible de visualiser des « traces électrophorétiques » mais les millions de séquences individuelles font l'objet d'une analyse séquentielle faisant intervenir plusieurs types d'outils. Les différentes étapes comprennent :

- la vérification de la qualité des données obtenues (*quality assessment*). Cette étape fait souvent appel à des outils développés par les fabricants des différentes plateformes de séquençage. Il est possible d'évaluer la qualité d'une expérience en utilisant l'outil **FastQC** (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). Il permet notamment d'évaluer la qualité des bases en fonction de leur position, les ratios entre bases, la longueur des séquences produites etc.;
- l'alignement sur une séquence de référence. Il s'agit d'une étape clé puisqu'il n'existe pas de logiciel ni de paramètres d'alignement idéaux. Il faut alors choisir un compromis entre le temps de calcul et la performance. Les outils les plus utilisés sont : **Bowtie 2** (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), **BWA** (pour Burrows-Wheeler Aligner) (<http://bio-bwa.sourceforge.net>), **Stampy** (www.well.ox.ac.uk/project-stampy), **SOAP** (pour Short Oligonucleotide Analysis Package) (<http://soap.genomics.org.cn>), **NovoAlign** (www.novocraft.com), **SSAHA2** (www.sanger.ac.uk/resources/software/ssaha2/), etc. À cette étape, le fichier généré est au format .SAM (pour *sequence alignment map*) ou sa version compressée. BAM (pour *binary alignment map*);
- l'identification de variants (*variant calling*). Il s'agit également d'une partie clé du processus. Là encore plusieurs outils sont disponibles et peuvent être spécialisés en fonction du contexte : mutations germinales ou somatiques, variations du nombre de copies (*copy number variation* [CNV]) et détection de grands réarrangements de type translocations, inversions ou grandes insertions/délétions. Les plus utilisés sont : **GATK** (www.broadinstitute.org/gatk/), **SAMtools** (<http://samtools.sourceforge.net>), **VarScan 2** (<http://varscan.sourceforge.net>) et **Atlas 2** (<https://www.hgsc.bcm.edu/software/atlas-2>), **Conifer**

(<http://conifer.sourceforge.net>), **EXCAVATOR** (<http://sourceforge.net/projects/excavatortool>), etc. Certains de ces outils peuvent détecter des mutations germinales et somatiques ainsi que de petits CNV.

À cette étape, les variants identifiés sont listés dans un fichier au format .VCF (pour *variant call format*). L'étape suivante consiste en leur annotation, c'est-à-dire à associer à chaque variation génomique un certain nombre d'informations permettant la filtration rapide des variants d'intérêt. Si ce principe semble simple, il n'existe pas aujourd'hui de standard d'annotation hormis la nomenclature des mutations (www.hgvs.org/mutnomen). Nous pouvons distinguer deux niveaux d'annotation :

- l'annotation du variant lui-même. Ceci comprend : la profondeur de lecture, la qualité (vraisemblance d'une mutation réelle), le génotype, la localisation (exonique, intronique, 5'UTR, etc.), l'impact théorique sur la/les protéine(s) codée(s) par le gène. À ces données de base peuvent être ajoutées des données externes telles que : la fréquence dans la base dbSNP ou dans des bases de données de variants partagés (*ExaC* : <http://exac.broadinstitute.org>; 1000genomes : www.1000genomes.org; *Exome Variant server* : <http://snpgs.washington.edu/EVS>) ainsi que des données relatives à sa pathogénicité potentielle (voir ci-dessous « Les outils de prédiction du caractère pathogène des mutations »);
- l'annotation du gène. Son implication décrite dans des pathologies (données généralement extraites de la base OMIM), son expression tissulaire, son rôle dans des processus biologiques et des voies métaboliques, son implication dans des fonctions moléculaires ainsi que sa localisation cellulaire, ceci par l'annotation de termes GO (pour *Gene Ontology*), de KEGG, BioCarta, etc.

Afin de faciliter l'annotation des fichiers .vcf, différents outils ont été développés et permettent d'aller chercher les informations dans différentes bases de données. Nous pouvons citer les outils **ANNOVAR** (www.openbioinformatics.org/annovar) et **Snpeff** (<http://snpeff.sourceforge.net>).

Les outils de prédiction du caractère pathogène des mutations

Si le caractère causal d'une mutation ne peut être déterminé qu'à l'aide de modèles expérimentaux (modèles cellulaires ou animaux), leur coût élevé et le temps nécessaire à leur réalisation a conduit à la création de systèmes

complexes de prédiction du caractère pathogène des mutations. Il existe de très nombreuses ressources plus ou moins spécialisées. Nous nous focaliserons ici sur celles pouvant être utilisées dans un contexte classique, c'est-à-dire pour aider à l'interprétation des mutations faux-sens ou introniques. En effet, près de 50 % des mutations pathogènes décrites correspondent à des mutations faux-sens dont l'interprétation est difficile. Parallèlement, un nombre croissant de mutations a un impact sur les signaux d'épissage. Si ces mutations altèrent le plus souvent les sites donneurs ou accepteurs d'épissage, elles peuvent également altérer la reconnaissance du point de branchement ou les signaux auxiliaires d'épissage que sont les ESE (pour *exonic splice enhancers*) et les ESS (pour *exonic splice silencers*) localisés dans les exons. Ainsi, il est maintenant reconnu que près de 30 % des mutations exoniques ont en fait un rôle délétère *via* leur conséquence sur l'épissage plutôt que sur la protéine. À ce sujet, il est utile de rappeler que les protéines mutantes ne sont que très rarement séquencées et que l'impact des mutations à leur niveau n'est souvent que théorique. À l'inverse, il est maintenant relativement simple d'étudier l'impact d'une mutation sur les transcrits soit directement soit *via* des systèmes dits « de minigènes ».

Les outils de prédiction du caractère pathogène des mutations introniques

Le splicéosome est l'une des macromolécules les plus complexes de la cellule et permet l'épissage des introns lors de la maturation de l'ARN pré-messager. Pour cela, il reconnaît différents signaux présents dans la séquence de l'ARN : les sites donneurs et accepteurs d'épissage, le point de branchement localisé en amont du site accepteur d'épissage et des séquences dites « auxiliaires d'épissage ». Ces dernières peuvent soit favoriser l'assemblage du splicéosome (ESE) soit l'inhiber (ESS). Ces différents motifs sont bien connus pour les trois premiers et relativement pour les derniers. Ceci a permis la création de nombreux outils d'analyse permettant de détecter ces signaux et éventuellement de prédire l'effet de mutations localisées à leur niveau. Les technologies utilisées divergent d'un système à l'autre et sont basées sur :

- la recherche de texte. Il s'agit de rechercher un motif exact dans une séquence. Ces systèmes sont peu performants pour l'étude de motifs dégénérés comme c'est le cas pour l'épissage en général. Un exemple est donné

par l'outil **SpliceAid 2** (http://193.206.120.249/splicing_tissue.html);

- l'utilisation de matrices de poids/position (*power weight matrix* [PWM]) qui sont des matrices de fréquences créées par alignement de motifs. Le poids de chaque base à chaque position peut correspondre à sa fréquence (systèmes simples) ou être modulé par l'importance de la position dans le motif (systèmes plus complexes qui intègrent une connaissance biologique). L'archétype de ces systèmes est l'outil **Human Splicing Finder** (HSF : <http://www.umd.be/HSF3>);
- des modèles markoviens. Ces modèles sont basés sur des règles de transition entre états. Un exemple est fourni par l'outil **MaxEntScan** (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html);
- des modèles d'intelligence artificielle ou réseaux neuronaux. Dans ces modèles, il n'existe plus d'algorithme prédéfini visant à calculer un score pour un motif. Ce calcul est réalisé par le système qui s'adapte aux données d'apprentissage qui lui sont fournies. Plus ces jeux d'apprentissage sont spécifiques d'une condition, site donneur d'épissage par exemple, plus le système aura de chance d'être performant. Un exemple de ce type d'outils est le système **NNSplice** (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Aujourd'hui la comparaison des performances des différents outils montre qu'ils ne sont pas équivalents et que ceux basés sur les PWM sont encore globalement les plus performants. Le système HSF est considéré comme le système de référence. Il permet en effet, en une seule étape, de prédire tous les types de signaux à partir d'une séquence quelconque et de prédire l'impact sur ces signaux de n'importe quelle mutation. Pour cela, il intègre des algorithmes provenant des systèmes les plus performants pour les sites d'épissage (HSF et MaxEnt) et pour les points de branchement (HSF). Pour les ESE/ESS, pour lesquels il est très difficile aujourd'hui de comparer les performances des systèmes, il intègre l'ensemble des algorithmes disponibles (HSF, ESE-Finder, Rescue-ESE) et des algorithmes créés à partir de jeux de données (*Octamers* PESE et PESS de Zhang *et al.* [1], *Exonic splicing regulatory elements* de Goren *et al.* [2], *Hexamers* EIE et IIE de Zhang *et al.* [3], *Decamers* de Wang *et al.* [4], les *motifs silencers* décrits par Sironi *et al.* [5], ainsi que de nouvelles matrices pour les protéines 9G8, Tra2 β et hnRNP A1).

La quantité d'informations disponibles est souvent un frein à la bonne interprétation des résultats et c'est pourquoi

la version 3 d'HSF intègre un système expert d'aide à l'interprétation des résultats. Il est néanmoins important que l'utilisateur se familiarise avec les seuils permettant de considérer une mutation comme pathogène.

Les outils de prédiction du caractère pathogène des mutations exoniques

Comme nous l'avons vu précédemment, les mutations les plus difficiles à interpréter sont les mutations faux-sens auxquelles il convient d'ajouter les mutations synonymes. En effet, leur impact théorique sur les protéines correspond au remplacement d'un acide aminé par un autre (mutations faux-sens) voire la production d'une protéine identique (mutations synonymes). Comment dans ces conditions prédire le caractère pathogène de ces mutations ? Différentes approches ont été élaborées et utilisent certains des critères biologiques suivants :

- la conservation des acides aminés au cours de l'évolution. Deux niveaux peuvent être considérés : la conservation à une échelle globale, l'ensemble des protéines, ou à l'échelle individuelle, la conservation d'une protéine donnée ;
- les propriétés physicochimiques des acides aminés telles que leur taille, leur charge, leur hydrophobicité, etc. ;
- la structure tridimensionnelle de la protéine et le positionnement de l'acide aminé dans cette structure ;
- les domaines protéiques d'intérêt pour la fonction de la protéine, sa structure ou ses modifications post-traductionnelles ;
- la fréquence de la mutation dans une population donnée (voir ci-dessus « Bases de données spécifiques de populations ») ;
- l'impact de la mutation sur les signaux d'épissage.

De nombreux outils de prédiction du caractère pathogène des mutations faux-sens sont disponibles tandis que quelques-uns seulement permettent de prédire en plus le caractère pathogène des mutations synonymes.

Ces outils utilisent des approches différentes qui leur confèrent des forces et des faiblesses. Nous pouvons en dresser une liste non-exhaustive afin d'illustrer la diversité des approches utilisées :

- utilisation de données de conservation seules : **PROVEAN** (<http://provean.jcvi.org/index.php>), **SIFT** (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>) ;
- utilisation de données de conservation, de fréquence dans le 1000genome Project, ClinVar et HGMD Public,

et impact sur les sites donneurs et accepteurs d'épissage : **MutationTaster** (www.mutationtaster.org) ;

- utilisation de données de conservation, des propriétés physico-chimiques des acides aminés et données structurales : **Polyphen-2** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) ;
- utilisation de données de conservation, de structures 3D et d'annotation des résidus fonctionnels : **MutationAssessor** (<http://mutationassessor.org>) ;
- utilisation de données de conservation, impact sur les sites d'épissage, annotation des résidus fonctionnels et utilisation des prédictions des outils SIFT et Polyphen-2 : **CADD** (<http://cadd.gs.washington.edu>) ;
- utilisation de données provenant d'autres outils de prédiction : **CONDEL** (SIFT, Polyphen-2 et Mutation Assessor : <http://bg.upf.edu/fannsdb>) ;
- utilisation de données de conservation, des propriétés physico-chimiques des acides aminés, d'annotation des résidus fonctionnels, de fréquence dans la population générale : **UMD-Predictor**[®] (<http://umd-predictor.eu>).

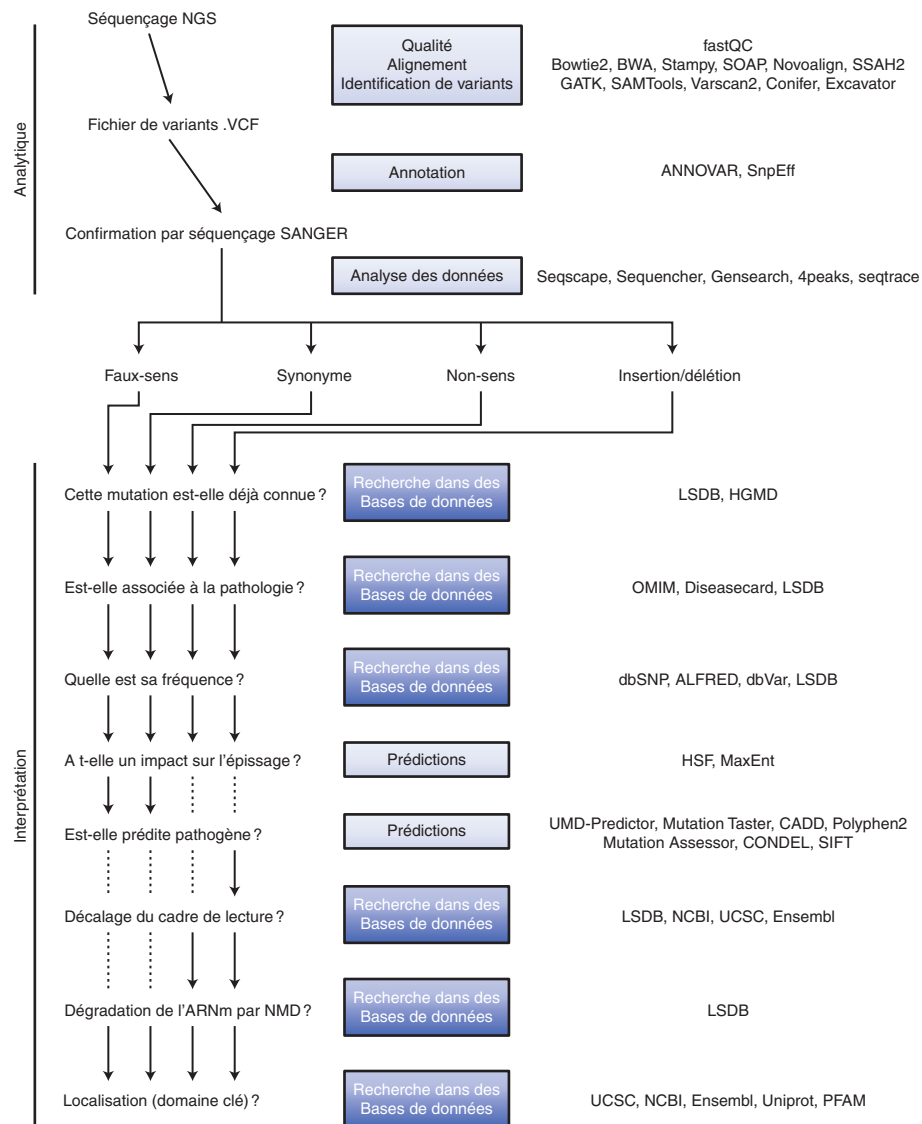
S'il n'existe pas de *gold standard* établi, l'outil UMD-Predictor[®] est à ce jour le plus performant, comme le démontre les nombreux tests réalisés sur plus de 140 000 variations de référence.

Conclusion

L'utilisation de bases de données et d'outils bioinformatiques est une étape indispensable dans la pratique quotidienne de la génétique. Il est donc indispensable, aussi bien pour les chercheurs que les généticiens et cliniciens, de bien maîtriser l'accès et le paramétrage de ces ressources.

Si nous reprenons les processus analytiques et d'interprétation des variations de séquence, nous pouvons constater qu'à chaque étape il est nécessaire d'avoir recours à ces ressources (figure 24.1).

Pour finir, le domaine de la bioinformatique en génétique est en constante évolution et de nouveaux outils/bases de données sont créés quotidiennement. Il est ainsi indispensable d'assurer une veille scientifique pour en faire une utilisation optimale et faciliter l'identification de variants pathogènes dans le cadre du diagnostic ou l'identification de nouveaux gènes dans le cadre de la recherche.

**Figure 24.1****Place des bases de données et outils informatiques dans l'analyse des mutations.**

Partie supérieure : étapes analytiques permettant à partir du séquençage NGS ou Sanger, d'identifier des mutations. Partie inférieure : principales étapes d'interprétation des variations en fonction de leur type, ne tenant pas compte des études de ségrégation familiale. Cadres grisés : étapes faisant appel à différents outils informatiques. Cadres noirs : étapes faisant appel à des bases de données. Pour chaque étape sont indiqués des exemples de ressources (colonne de droite). NMD : *nonsense-mediated decay* (dégradation de l'ARN messager suite à la reconnaissance d'un codon stop prématuré).

Références

- [1] Zhang XHF, Kangsamaksin T, Chao MSP, et al. Exon inclusion is dependent on predictable exonic splicing enhancers. *Mol Cell Biol* 2005; 25(16) : 7323–32.
- [2] Goren A, Ram O, Amit M, et al. Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences – The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell* 2006; 22(6) : 769–81.
- [3] Zhang C, Li WH, Krainer AR, et al. RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 : 5797–802.
- [4] Wang Z, Rolish ME, Yeo G, et al. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 2004; 119(6) : 831–45.
- [5] Sironi M, Menozzi G, Riva L, et al. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(5) : 1783–91.

This page intentionally left blank

Perspectives thérapeutiques en génétique médicale

Martin Krahn, Nicolas Lévy

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	274
Approches pharmacologiques pour les maladies monogéniques	275
La thérapie cellulaire	277
La thérapie génique	279
Conclusion	283



L'essentiel à retenir

Les maladies génétiques constituent encore à ce jour un domaine de la médecine qui reste en grande partie dépourvu de thérapeutiques spécifiques. La prise en charge symptomatique des patients, qui nécessite une coordination multidisciplinaire, constitue actuellement la réelle base de leur traitement au quotidien (voir [préface](#)).

Néanmoins, les progrès importants réalisés dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, ainsi qu'une meilleure maîtrise des outils technologiques disponibles, sont aujourd'hui à l'origine de la diversification des approches thérapeutiques étiologiques envisagées pour les maladies génétiques. Les **approches pharmacologiques pour les maladies monogéniques** bénéficient en particulier de la caractérisation de cibles pharmacologiques nouvelles et comportent dorénavant pour certaines un développement «à la carte» en fonction de l'anomalie génétique causale. Dans le domaine de la **thérapie cellulaire**, les différentes sources de cellules-souches (notamment cellules-souches adultes et, depuis peu, les cellules-souches pluripotentes induites) permettent d'envisager des applications pour la régénération de différents tissus. Concernant les approches basées sur la **thérapie génique**, de nombreuses preuves de principe obtenues dans le cadre d'essais précliniques ont été suivies par les premières réussites thérapeutiques chez l'Homme, avec une reconsidération essentielle du rapport risque-bénéfice.

Le développement de ces différentes approches thérapeutiques est favorisé aujourd'hui notamment par des mesures incitatives à destination de l'industrie pharmaceutique.

Introduction

Les maladies génétiques constituent encore à ce jour un domaine de la médecine qui reste en grande partie dépourvu de thérapeutiques spécifiques. Néanmoins, les progrès importants réalisés dans l'identification des bases génétiques, des anomalies physiopathologiques induites et ainsi de cibles thérapeutiques potentielles, associées au développement de stratégies thérapeutiques innovantes, a permis au cours de ces dernières années une multiplication des preuves de

principe expérimentales, des essais thérapeutiques entrepris (dont les informations actualisées sont consultables sur le site *Clinical Trials*; <https://clinicaltrials.gov>), et même des réussites d'approches thérapeutiques menées chez l'Homme.

L'engouement initial, et probablement trop exclusif, vers les approches thérapeutiques basées sur le transfert de gène, cède maintenant la place à une vision plus diversifiée des possibilités de prise en charge thérapeutique des patients.

Comme pour toute pathologie, cette prise en charge doit prendre en compte les mesures symptomatiques disponibles qui peuvent bénéficier aux patients. En raison de la grande diversité des pathologies et des approches thérapeutiques symptomatiques, il n'est pas possible d'en faire l'inventaire exhaustif. Il est néanmoins essentiel de souligner que la prise en charge symptomatique des patients, grâce à une coordination multidisciplinaire avec les autres spécialités médicales et paramédicales, constitue la base réelle de leur traitement au quotidien (voir [préface](#)), en espérant de voir dans les années à venir émerger de nouveaux traitements étiologiques.

Ces traitements étiologiques tant attendus dans notre spécialité médicale bénéficient aujourd'hui des connaissances accumulées depuis les années 1970, dans les domaines de la thérapie génique et de la thérapie cellulaire. Les outils technologiques sont devenus de plus en plus matures, les réussites et effets secondaires, néfastes ou parfois bénéfiques de manière inattendue, ont souligné le principe essentiel de l'évaluation du rapport risque/bénéfice, particulièrement important lorsque l'intervention à but étiologique vise à corriger directement le défaut génétique. Mais, en parallèle des progrès dans le domaine de la thérapie génique et de la thérapie cellulaire, il est essentiel de souligner le rôle important que prennent désormais les approches pharmacologiques «classiques» en raison de la meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies génétiques et, donc, de l'identification de cibles thérapeutiques.

Le contexte général dans lequel s'effectue le développement des nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies génétiques a également évolué. L'intérêt, auparavant faible, de l'industrie pharmaceutique pour le développement de «médicaments» dont le marché potentiel est restreint lorsqu'il s'agit de maladies rares, a été stimulé par des mesures incitatives au niveau national et européen, avec notamment la création du statut de «médicament orphelin» (règlement [CE] n° 141/2000 du Parlement européen et du Conseil de l'Union européenne du 16 décembre 1999 concernant les médicaments orphelins) permettant un processus de développement dans des conditions facilitées (subventions spécifiques, réduction des frais d'enregistrement, extension des délais d'exclusivité d'exploitation, etc.). De plus, de nombreux

exemples ont permis de démontrer que les connaissances issues du développement d'approches thérapeutiques pour les maladies génétiques bénéficient aux maladies communes.

À défaut de pouvoir être exhaustif, ce chapitre a pour objectif de décrire les principaux concepts des approches thérapeutiques prometteuses actuellement en développement pour les maladies génétiques.

Approches pharmacologiques pour les maladies monogéniques

Notions générales

Classiquement, la connaissance du mécanisme physiopathologique de la maladie concernée est la clé pour une approche pharmacologique. Les progrès très importants dans l'identification des gènes et des mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies monogéniques conduisent depuis quelques années à la caractérisation de cibles pharmacologiques potentielles (de ce point de vue, le terme « innovant » n'est donc pas à réserver aux « biothérapies »!). Dans ce cadre, les approches pharmacologiques peuvent nécessiter une détermination précise du génotype

des patients, permettant d'utiliser certaines molécules « à la carte » en fonction des mutations.

L'utilisation de modèles cellulaires ou animaux permet d'évaluer des molécules actives sur les cibles pharmacologiques caractérisées. Ceci peut faire appel éventuellement à l'utilisation de plateformes de criblage pharmacologique, dans lesquelles des milliers de composés chimiques, connus ou nouveaux, peuvent être évalués. Le criblage pharmacologique à haut débit permet également de chercher des composés actifs pour des maladies au mécanisme physiopathologique encore méconnu, à condition de disposer d'un test fonctionnel cellulaire pour mesurer l'efficacité potentielle des différentes molécules.

De nombreux chercheurs misent donc sur les approches pharmacologiques « classiques », basées sur une meilleure connaissance de la physiopathologie des maladies génétiques, actuellement bien mieux maîtrisées que les biothérapies. Devant la diversité des approches pharmacologiques, il n'est pas utile d'en faire ici l'inventaire. Il est par contre important de souligner qu'au cours de ces dernières années, différentes approches pharmacologiques « classiques » ont permis de contribuer au traitement de patients atteints de maladies génétiques, sur le plan symptomatique ou étiologique ([tableau 25.1](#)). Parmi celles-ci, les

Tableau 25.1. Illustration de certaines preuves de principe ou applications thérapeutiques basées sur des approches pharmacologiques pour les maladies génétiques.

Maladie génétique	Approche thérapeutique	Année de réalisation
Certaines maladies métaboliques (mucopolysaccharidose de type I et II; maladie de Fabry; maladie de Gaucher; maladie de Pompe; autres)	Enzymothérapie substitutive : plusieurs médicaments ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) (dont Aldurazyme®, Elaprase®, Fabrazyme®, Cerezyme®, Myozyme®)	Successivement depuis 1991
Ataxie de Friedreich	Démonstration de l'effet de la déféripone, un chélateur du fer, sur les dépôts de fer dans certaines zones cérébrales des patients, associé à une amélioration des atteintes neurologiques Effet protecteur des quinones à courte chaîne ou des chélateurs du fer sur la cardiomyopathie	Depuis 2007
Progéria	Essais thérapeutiques en cours avec des inhibiteurs spécifiques bloquant l'accumulation de lamine farnésylée (protéine impliquée dans la progéria)	Depuis 2007
Dystrophie musculaire de Duchenne	Démonstration de la bonne tolérance de l'ataluren (Translarna™), médicament pour la translecture de codons stop, puis suspension des essais cliniques en raison d'un manque d'efficacité sur les critères d'amélioration évalués	2009-2010
	Reprise des essais suite à des adaptations de dose spécifiques, avec démonstration d'un effet bénéfique sur certains critères d'évaluation	2013
	AMM conditionnelle	2014

(Suite)

Tableau 25.1. Suite.

Maladie génétique	Approche thérapeutique	Année de réalisation
Amyotrophie spinale	Démonstration d'un maintien des fonctions motrices et une réduction des complications (en particulier respiratoires) obtenu suite au traitement par l'olésoxime (neuroprotecteur), et engagement des démarches pour une AMM	2014
Mucoviscidose	AMM de l'ivacaftor (Kalydeco®; médicament à effet spécifique sur les conséquences de la mutation G551D, permettant d'améliorer le défaut de fonctionnement du canal CFTR), suite à la démonstration de son efficacité sur certains paramètres respiratoires et l'état nutritionnel	2012
	Extension progressive de l'autorisation de mise sur le marché pour d'autres mutations : G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N et S549R	Depuis 2012
Cancers héréditaires du sein et de l'ovaire causés par des mutations des gènes <i>BRCA1</i> et 2	Développement des inhibiteurs spécifiques de la Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) ayant un effet destructeur ciblé sur les cellules tumorales	Depuis 2005

enzymothérapies substitutives constituent maintenant une catégorie bien individualisée. Plus récemment, des **approches pharmacologiques ciblant directement les anomalies génétiques causales** ont vu le jour.

Les enzymothérapies substitutives

Les enzymothérapies substitutives constituent une approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'enzymes synthétiques (produites par différents procédés biotechnologiques), dans l'objectif de compenser un déficit existant chez des patients porteurs de mutation(s) délétère(s) dans le gène correspondant. Cette approche thérapeutique trouve son application pour différentes pathologies génétiques monogéniques, et en particulier pour le groupe des maladies métaboliques caractérisé par le défaut d'origine génétique de l'une des enzymes essentielles au métabolisme cellulaire. À ce jour, différentes enzymes recombinantes sont disponibles pour le traitement, avec divers niveaux d'efficacité, de certaines maladies métaboliques. Ceci concerne notamment les maladies lysosomales, affectant le métabolisme des glucides et des lipides.

Approches pharmacologiques ciblant directement les anomalies génétiques causales

Certaines approches pharmacologiques dans les maladies génétiques ciblent aujourd'hui directement

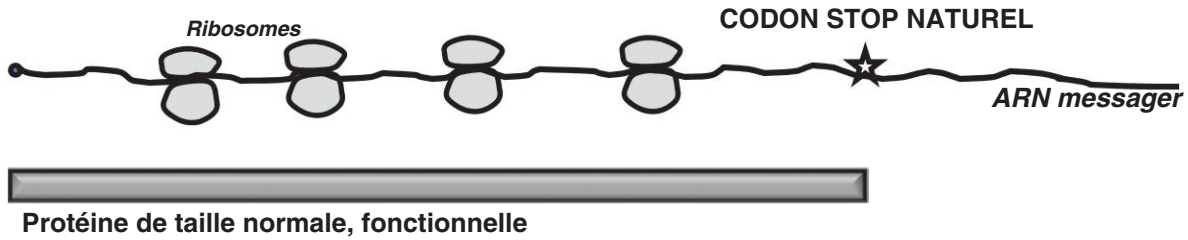
l'anomalie génétique causale. Par exemple, l'approche thérapeutique par « saut d'exon » (détaillée dans la section « thérapie génique ») est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides qui peuvent être administrés sous différentes formes pharmacologiques, dont l'action à visée thérapeutique consiste en une modification induite d'ARN messagers mutés.

Une autre stratégie en cours d'évaluation est l'approche de « **translecture de codons stop** » (ou « stop-codon readthrough », littéralement lecture à travers le codon stop, e-figure 25.1). Cette approche vise à corriger les mutations de type non-sens, qui représentent 10 à 20 % des mutations délétères dans les gènes.

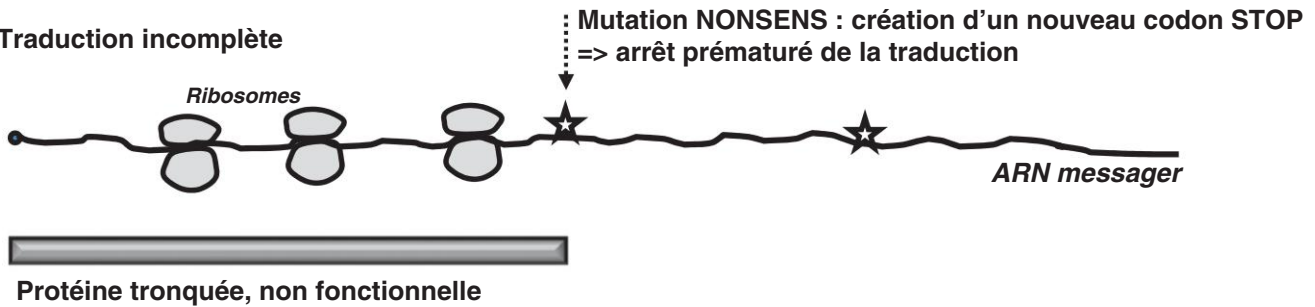
D'autres approches pharmacologiques visent à corriger les anomalies génétiques causales en modifiant directement le patrimoine génétique, en particulier par **correction ciblée de mutations**, associant des étapes de ciblage de l'ADN (reconnaissance d'une séquence génomique spécifique à modifier), de coupure enzymatique spécifique de l'ADN et de correction de l'anomalie par différents mécanismes de réparation de l'ADN (notamment basés sur le phénomène de recombinaison homologue). Différents procédés ont été mis au point, comme les enzymes de restriction de type nucléases à doigt de zinc et méganucléases, ou plus récemment les systèmes de modification site-spécifique de type TALEN ou CRISPR/Cas9. Ces approches ont un potentiel thérapeutique important, mais sont à ce jour encore au stade expérimental en ce qui concerne les applications cliniques éventuelles.



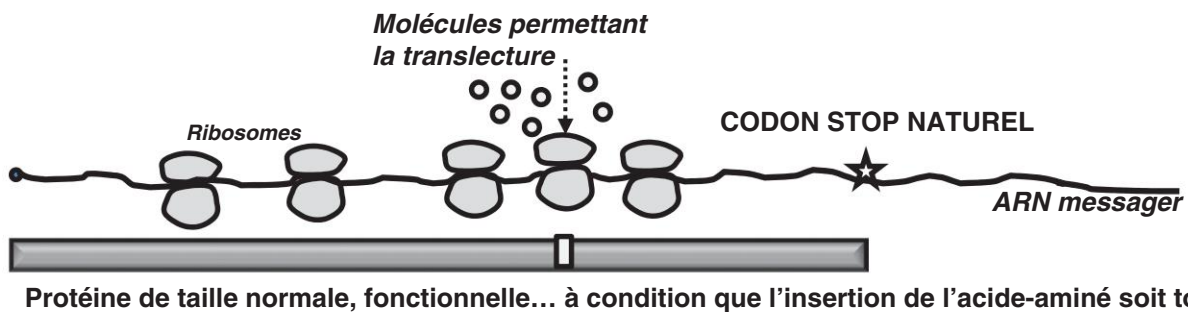
Traduction normale



Traduction incomplète



Translecture de Codons STOP Insertion d'un acide-aminé « au hasard »



e-figure 25.1

Principe de la translecture de codons stop.

Normalement, la lecture complète d'un ARN messenger au cours du phénomène de traduction permet la synthèse d'une protéine complète fonctionnelle. En cas de mutation non-sens, la traduction est interrompue prématurément, ce qui peut conduire à la synthèse d'une protéine tronquée, anormale. Par le phénomène de « translecture », induit par certaines molécules (par exemple, la gentamycine ou le PTC124-ataluren [Translarna®]), un codon stop formé par une mutation non-sens peut être « corrigé » : un acide aminé pris au-hasard (ou avec un certain degré de sélectivité en fonction des conditions cellulaires et du contexte de séquence génétique dans l'environnement de la mutation non-sens) sera incorporé à cet endroit au niveau de la protéine en cours de formation. Ceci permet alors la poursuite de la traduction et d'obtenir une protéine complète de longueur normale, qui peut être fonctionnelle à condition que l'incorporation de l'acide aminé « au-hasard » soit tolérée (il ne s'agit pas forcément du bon acide aminé au bon endroit de la protéine !).

La thérapie cellulaire

Définition et notions générales

La thérapie cellulaire est définie par l'ensemble des techniques permettant la manipulation ou la transformation d'une cellule ou d'un tissu, afin de leur conférer des fonctions nouvelles, en l'occurrence thérapeutiques.

Un élément central de la thérapie cellulaire est l'utilisation de cellules-souches. Les cellules-souches ont par définition des capacités **d'autorenouvellement** et de **différenciation multilignée** (figure 25.2). La biologie cellulaire des cellules-souches est un domaine encore en pleine expansion et comportant de nombreuses inconnues. On considère que, par un phénomène de division cellulaire asymétrique, une cellule-souche mère conduira à la formation d'une cellule-souche fille permettant le maintien d'un stock de cellules-souches et, donc, de la capacité d'autorenouvellement, et, dans le même temps, de la formation d'une cellule fille qui s'engagera dans la différenciation cellulaire, appelée cellule progénitrice. Cette cellule progénitrice va progressivement acquérir des spécificités fonctionnelles au cours du phénomène de différenciation cellulaire, mais perdre les capacités d'autorenouvellement.

Sur la base du potentiel de régénération tissulaire des cellules-souches, la thérapie cellulaire consiste à utiliser celles-ci afin de remplacer des cellules défectueuses d'un

tissu, et sur celle des capacités d'autorenouvellement, qui permettent d'envisager idéalement le maintien d'un stock de cellules à moyen ou long terme.

Il est à souligner que la prolifération cellulaire, souhaitée dans le cadre d'une régénération tissulaire thérapeutique, doit être précisément maîtrisée afin d'écartier d'éventuels risques de dégénérescence tumorale.

Différents types de cellules-souches utilisables pour la thérapie cellulaire

À ce jour, les différents types de cellules-souches potentiellement utilisables pour la thérapie cellulaire sont les cellules-souches embryonnaires, les cellules-souches adultes, et depuis peu les cellules-souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells* [IPS]). Le [tableau 25.2](#) illustre des exemples d'application de la thérapie cellulaire dans le cadre des maladies génétiques.

Cellules-souches embryonnaires

Les cellules-souches embryonnaires, qui peuvent être obtenues à des stades très précoces de la différenciation embryonnaire (notamment à partir d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro*), possèdent la caractéristique de *totipotence*. Il s'agit du pouvoir de différenciation vers toutes les lignées cellulaires.

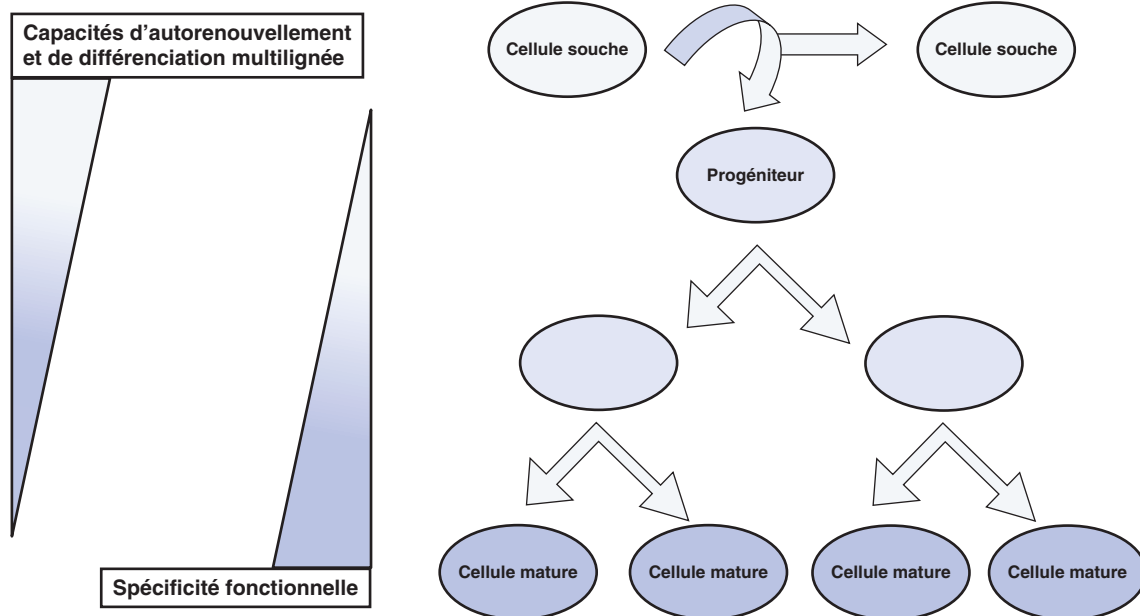


Figure 25.2

Représentation schématique des capacités d'autorenouvellement et de différenciation multilignée des cellules-souches.

Tableau 25.2. Illustration de certaines preuves de principe ou applications thérapeutiques basées sur la thérapie cellulaire pour les maladies génétiques.

Maladie génétique	Approche thérapeutique	Année de réalisation
Hémoglobinopathies	Traitement curatif par cellules-souches hématopoïétiques (greffe de moelle osseuse)	Depuis les années 1980
Certains déficits immunitaires innés (ADA-SCID, X-SCID; autres)	Traitement curatif par cellules-souches hématopoïétiques (greffe de moelle osseuse)	Depuis les années 1980
Certaines maladies métaboliques (mucopolysaccharidoses, maladie de Gaucher, autres)	Traitement par cellules-souches hématopoïétiques (greffe de moelle osseuse) permettant une amélioration fonctionnelle (mais pas d'effet sur les manifestations neurologiques)	Depuis 1981
Maladie de Huntington	Un suivi à long terme montre une stabilisation partielle, mais pas de guérison, chez des patients atteints de maladie de Huntington traités avec des cellules-souches fœtales	2006
Différentes formes de myopathies, dont dystrophie musculaire de Duchenne	Après des essais initiaux décevants de greffe de myoblastes (années 1990), de nouveaux essais thérapeutiques sont en cours pour l'évaluation de la tolérance et fonctionnalité de la thérapie cellulaire, avec différentes sources cellulaires (mésangioblastes, AC133, etc.)	Depuis le milieu des années 2000

Théoriquement, dans des conditions de culture cellulaire adéquate *in vitro*, les cellules-souches embryonnaires peuvent être différenciées en tout type de cellules matures. Dans une démarche de thérapie cellulaire, il serait donc possible soit d'implanter des cellules-souches directement, soit des cellules matures obtenues *in vitro* par différenciation ciblée de cellules-souches embryonnaires.

Les cellules embryonnaires ont donc des intérêts thérapeutiques éventuels très nombreux. Mais de nombreuses questions, notamment d'ordre éthique, sont soulevées et l'utilisation des cellules-souches embryonnaires est très encadrée sur le plan législatif. En France, la nouvelle loi relative à la bioéthique (7 juillet 2011) a maintenu la possibilité pour les équipes de recherche françaises de réaliser, dans le cadre de protocoles autorisés et par dérogation, des recherches sur les cellules-souches embryonnaires, notamment lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition qu'il soit expressément établi qu'il est impossible de parvenir au résultat escompté par le biais d'une recherche ne recourant pas à des embryons humains, des cellules-souches embryonnaires ou des lignées de cellules-souches.

Cellules-souches pluripotentes induites (IPS)

Une alternative à l'utilisation des cellules-souches embryonnaires est représentée par la possibilité de créer des cellules IPS. Les travaux pionniers de Takahashi *et al.* (2007) ont montré qu'il était possible de reprogrammer des cellules matures grâce à l'expression de différents facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC). Ce procédé permet d'obtenir des cellules *embryonnaires-like*, ayant des caractéristiques très proches (mais pas identiques...) aux véritables cellules-souches embryonnaires. Les cellules IPS saines constituent donc une source potentielle de thérapie cellulaire. En dehors du domaine de la thérapie cellulaire, cette approche permet la création de lignées de cellules malades, porteuses d'un défaut génétique donné, et pouvant être utilisées pour un criblage moléculaire pharmacologique. Cette technologie innovante présente de très nombreuses perspectives mais est confrontée encore à ce jour à de nombreux obstacles pratiques (faible efficacité de la reprogrammation cellulaire; oncogénicité potentielle, etc.).

Cellules-souches adultes

L'alternative majeure à l'utilisation de cellules-souches embryonnaires réside en l'utilisation de cellules-souches

adultes. De nombreux travaux ont établi clairement que des cellules-souches ou cellules progénitrices très immatures existent dans tous les tissus d'un organisme adulte (cellules-souches hématopoïétiques, neuronales, musculaires, épidermiques, pancréatiques, hépatiques, etc.). Les cellules-souches adultes possèdent la caractéristique de *multipotence*, c'est-à-dire le pouvoir de différenciation des progéniteurs vers plusieurs lignées cellulaires du tissu considéré. Dans certaines conditions spécifiques les cellules-souches adultes peuvent également subir un phénomène de **transdifférenciation**, c'est-à-dire la différenciation d'une lignée cellulaire vers une autre lignée cellulaire. Contrairement aux autres cellules-souches embryonnaires, les questions éthiques sont ici similaires aux problèmes soulevés par les greffes d'organes.

La thérapie génique

Définition et notions générales

La thérapie génique consiste à modifier dans un but thérapeutique le matériel génétique des cellules ciblées.

Dans le cadre des maladies génétiques, le principe de corriger le défaut génétique dans un objectif thérapeutique est schématiquement évident. La thérapie génique a ainsi été initialement développée dans le domaine des maladies génétiques monogéniques. Mais devant le potentiel thérapeutique éventuel issu de l'intervention à visée thérapeutique sur le patrimoine génétique des cellules, cette approche a été étendue largement à de nombreuses maladies polyfactorielles, en particulier dans le domaine de la cancérologie et des maladies infectieuses.

Dès le début des années 1970, le concept d'utiliser à des fins thérapeutiques de l'ADN exogène pour remplacer un ADN muté chez des patients atteints de maladies génétiques a été évoqué par certains scientifiques (Rogers, puis Friedmann et Roblin). Une vingtaine d'années de développement expérimental ont été nécessaires ensuite pour permettre la réalisation d'un premier essai clinique utilisant cette approche chez l'humain, dirigé aux États-Unis par l'équipe du Dr French Anderson en 1990, dans le cadre d'une maladie génétique rare du système immunitaire (ADA-SCID). Dix années après ce premier essai clinique, l'équipe du Pr Alain Fischer, en France, a mené avec succès un essai clinique qui a permis pour la première fois, au

niveau mondial, de guérir des patients par thérapie génique, et ceci dans le cadre d'une autre maladie génétique rare du système immunitaire (X-SCID).

Le nombre d'essais cliniques utilisant la thérapie génique continue à augmenter, avec à ce jour plus de 2 000 essais cliniques répertoriés à travers le monde (base de données des essais cliniques du *Journal of Gene Medicine* : www.abedia.com/wiley). Ces essais sont majoritairement à des stades précoces (surtout des essais de phase I), et concernent pour plus de 60 % le domaine de la cancérologie et pour 9 % celui des maladies monogéniques. *Malgré l'essor continu de cette approche thérapeutique, il est important de souligner à nouveau que la thérapie génique constitue à ce jour de manière non exclusive l'une parmi diverses autres perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques.*

Transfert de gène et vecteurs de thérapie génique

Le concept essentiel de la thérapie génique pour les maladies génétiques monogéniques est celui du transfert de gène. L'objectif est de modifier à visée thérapeutique le patrimoine génétique de cellules mutées, par l'apport d'acides nucléiques exogènes, afin de corriger le défaut génétique.

Les outils permettant d'effectuer le transfert de gène sont appelés « **vecteurs** », et constituent deux catégories :

- **les vecteurs viraux** : il s'agit de systèmes de transfert de gène développés par ingénierie génétique de virus sauvages. Différents types de vecteurs viraux ont été mis au point et comportent, en fonction du virus sauvage dont ils sont dérivés, des avantages et inconvénients spécifiques (par exemple, la taille plus ou moins grande de la séquence pouvant être transférée, le tropisme du vecteur permettant un transfert de gène dans un type cellulaire spécifique, l'intégration ou non du vecteur dans le génome de la cellule hôte, qui conditionne la stabilité du transfert de gène ou alors la perte du vecteur au cours de la division cellulaire, ou encore la toxicité spécifique liée à chaque type de vecteur) ;
- **les systèmes de transfert non-viraux** (ou vecteurs non-viraux), basés sur l'utilisation de méthodes physiques et/ou chimiques pour le transfert de gène.

Les principales caractéristiques des vecteurs viraux et des systèmes de transfert non-viraux sont détaillées dans le [tableau 25.3](#).

Tableau 25.3. Principales caractéristiques des vecteurs viraux et des systèmes de transfert non viraux.

Catégorie de vecteurs	Principe du transfert de gène	Principales caractéristiques	Exemples
Vecteurs Viraux	Modification de virus sauvages par ingénierie génétique*	– Efficacité importante du transfert de gène – Spécificité cellulaire du transfert de gène en fonction du type de vecteur viral – Risque de toxicité virale et/ou d'immunogénicité	– Vecteurs rétroviraux – Vecteurs lentiviraux – Vecteurs adénoviraux – Vecteurs adénoassociés (« AAV »)
Systèmes de transfert non viraux	Méthodes physiques et/ou chimiques	– Risque de toxicité réduit – Efficacité inférieure en comparaison au transfert viral	– Transfert d'acides nucléiques « nus » – Transfert d'acides nucléiques associés à des composés chimiques (surtout cationiques de type lipidique ou peptidique) permettant leur stabilisation et facilitant le passage transmembranaire et cytoplasmique vers le noyau des cellules cibles – Électroporation – Magnétofection

* Le cycle viral de virus sauvages naturels implique le transfert du génome viral dans le génome de la cellule hôte, sur la base de systèmes très efficaces de transfert de gène sélectionnés au cours de millions d'années d'évolution.

Principales stratégies de thérapie génique

Deux stratégies principales existent à ce jour : la thérapie génique, basée sur le transfert d'un « transgène », et la thérapie génique par modulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes des cellules cibles.

Thérapie génique basée sur le transfert d'un « transgène »

Un transgène est constitué par une séquence permettant d'exprimer un ARN messager d'intérêt et comporte habituellement la séquence codant la protéine d'intérêt (en totalité si possible, ou parfois de manière partielle en fonction de certaines restrictions qui peuvent être liées au type de vecteur), en association à des séquences régulant l'expression de ce transgène (de préférence les éléments régulateurs naturels du gène d'intérêt). Effectivement, le transfert du transgène doit permettre l'expression de la protéine d'intérêt, dont le gène est muté dans les cellules cibles. Pour obtenir un effet thérapeutique, cette expression doit être régulée de manière précise afin de reproduire le mieux possible la situation physiologique. Le choix des éléments régulateurs associés au transgène est alors essentiel pour permettre d'obtenir un niveau

quantitatif adapté (expression suffisante pour permettre de rétablir la fonction déficitaire, mais non en excès afin d'éviter des conséquences toxiques liées à la surexpression) et une spécificité tissulaire de l'expression. En effet, les conséquences toxiques liées à l'expression ectopique du transgène, et ceci en particulier dans les cellules du système immunitaire capables de présenter les antigènes, constituent l'une des principales limites de cette stratégie de thérapie génique.

Thérapie génique par modulation de l'expression

Depuis plusieurs années, la stratégie de thérapie génique par modulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes des cellules cibles a été développée comme alternative au transfert de transgène. L'avantage majeur de cette stratégie est d'agir directement sur un ARN messager exprimé par les cellules cibles et donc régulé de manière précise grâce aux mécanismes endogènes.

La modulation de l'expression peut être quantitative ou qualitative et sera réalisée par l'apport d'acides nucléiques qui vont interférer avec certains ARN messagers des cellules cibles.

Le phénomène d'« ARN interférence » est à la base des stratégies de **modulation quantitative de l'expression** : l'interaction spécifique entre des ARN simples ou double

brin avec des ARN messagers permet la dégradation de ces derniers. Cette approche trouve son application notamment pour dégrader de manière spécifique des ARN messagers mutés codant des protéines toxiques. D'autres approches de modulation quantitative de l'expression permettent au contraire la stabilisation de certains ARN messagers mutés afin d'éviter leur dégradation.

La **modulation qualitative de l'expression** consiste à intervenir de manière ciblée sur l'ARN messenger, notamment à l'étape d'épissage au cours de sa maturation, pour éliminer des mutations délétères. Nous pouvons souligner à nouveau que l'action directe au niveau de l'ARN messenger permet de bénéficier de la régulation endogène du niveau quantitatif et de la spécificité tissulaire de l'expression. La principale approche de modulation qualitative de l'expression développée

à ce jour est le « saut d'exon » (*exon skipping*), dont le principe est illustré par la [figure 25.3](#).

D'autres approches sont développées sur le plan expérimental, comme le « trans-épissage » (*trans-splicing*) dont l'objectif est de remplacer une partie d'un ARN messenger porteur d'une mutation délétère par le transfert de gène d'une séquence normale (un fragment de séquence qui remplacera la partie mutée de l'ARN messenger), en intervenant au niveau de l'épissage.

Thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*

Les cellules ciblées par le transfert de gène dans le cadre de la thérapie génique sont essentiellement des cellules somatiques. Effectivement, la thérapie génique sur des cellules germinales n'est pas envisageable chez l'Homme puisqu'elle soulève des questions éthiques en lien avec la modification génétique

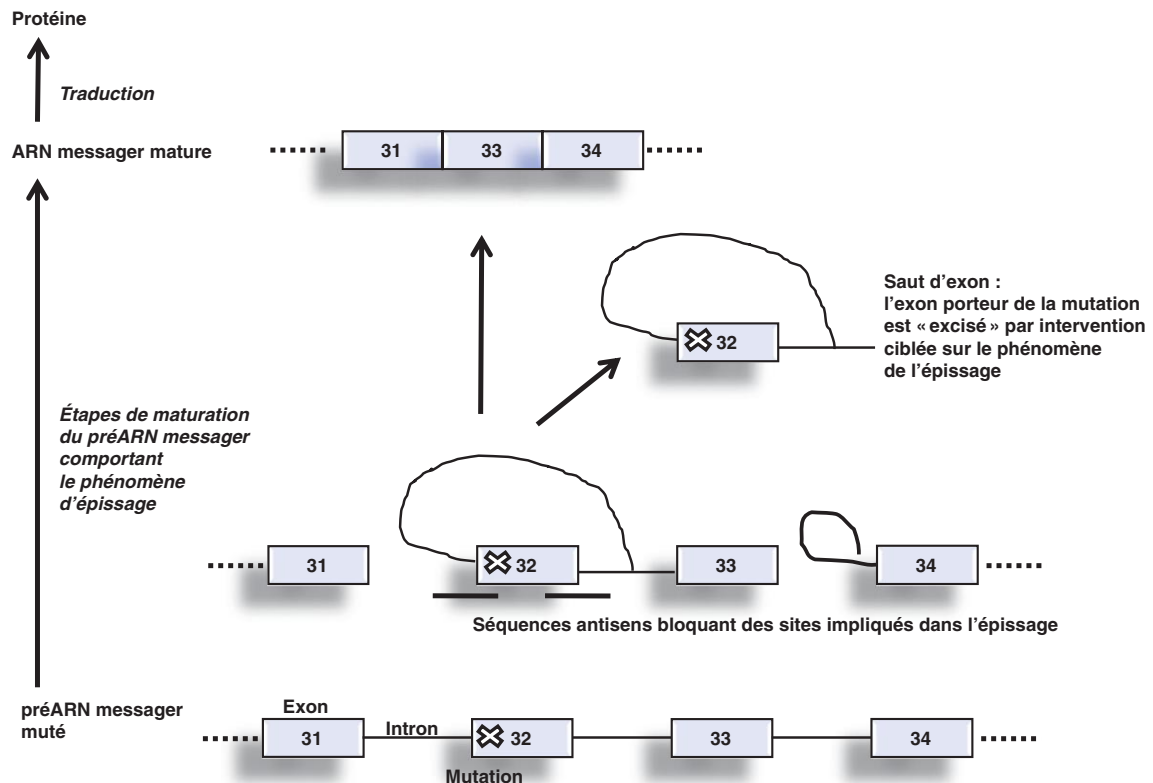


Figure 25.3

Représentation schématique de la stratégie de modulation de l'expression de type « saut d'exon ».

Le « saut d'exon » a pour objectif d'induire de manière sélective la délétion d'un ou de plusieurs exons d'un préARN messenger. Ceci est réalisé grâce à l'utilisation d'oligonucléotides « antisens » dont la séquence est spécifique de séquences d'intérêt au niveau du préARN messenger ciblé et, notamment, de régions impliquées dans le phénomène de l'épissage. Ces séquences d'intérêt seront ainsi « masquées » suite à l'hybridation des oligonucléotides « antisens », ce qui conduira à une modification du processus d'épissage. Le plus couramment, le « saut d'exon » est réalisé de manière à modifier l'épissage afin de déléter de manière ciblée un exon porteur d'une mutation délétère (ou plusieurs exons de manière simultanée selon le type de mutation), tout en maintenant un cadre de lecture ouvert.

L'ARN messenger mature, et ainsi la protéine qui en résulte, comportera donc une délétion qui correspond à la partie « excisée » par le « saut d'exon ». Cette stratégie ne peut ainsi avoir un intérêt thérapeutique qu'à condition que la partie « excisée » ne soit pas essentielle à la fonction de la protéine concernée : suite à la délétion de l'exon porteur de la mutation, une protéine partiellement tronquée, mais maintenant une fonctionnalité au moins partielle, doit pouvoir être exprimée.

de cellules-souches embryonnaires ou de cellules germinales, qui seraient donc transmissibles de génération en génération (comme ceci est le cas dans le cadre de la transgénèse réalisée chez l'animal, pour des applications diverses telles la création de modèles animaux de pathologie ou la création de « bioréacteurs » permettant de produire des substances pharmacologiques).

Le transfert de gène dans les cellules cibles peut s'effectuer directement dans le tissu ou organe d'intérêt (**transfert de gène *in vivo***), de différentes manières par injection systémique, ou locale comme au niveau de la rétine ou du tissu musculaire.

Une alternative à ce transfert de gène direct est constituée par le **transfert de gène *ex vivo***. Il s'agit d'un procédé comportant plusieurs étapes successives :

- une étape de prélèvement des cellules d'intérêt chez l'individu à traiter ;

- une étape de culture de ces cellules d'intérêt (*ex vivo*) ;
- la réalisation du transfert de gène sur les cellules d'intérêt pendant l'étape de culture ;
- la réimplantation chez l'individu des cellules modifiées par le transfert de gène.

Le transfert de gène *ex vivo* trouve son application principale dans la thérapie génique ciblant des cellules-souches adultes, dans l'objectif de bénéficier de leurs propriétés d'autorenouvellement et de permettre de cette manière la formation de cellules matures, pour lesquelles le défaut génétique aura été corrigé. Cette approche combine donc la thérapie génique et la thérapie cellulaire, et permettrait théoriquement d'obtenir un effet thérapeutique par transfert de gène unique et stable. À ce jour, différents essais cliniques ([tableau 25.4](#)) utilisant un transfert de gène *ex vivo* ont été menés, notamment ciblant des cellules-souches

Tableau 25.4. Illustration de certaines preuves de principe ou applications thérapeutiques basées sur la thérapie génique pour les maladies génétiques.

Maladie génétique	Approche thérapeutique	Année de réalisation
Déficits immunitaires combinés sévères innés	Approche thérapeutique de type <i>ex vivo</i> sur des cellules-souches hématopoïétiques	
X-SCID	X-SCID : premier véritable succès international d'un essai clinique de thérapie génique	2000
ADA-SCID	ADA-SCID : succès thérapeutique similaire pour une autre forme de déficit immunitaire combiné sévère inné <i>Cette approche thérapeutique a pu ensuite être appliquée avec succès pour plus d'une vingtaine d'enfants (guérison du déficit immunitaire)</i> <i>Des complications sévères survenues chez plusieurs enfants traités par cette approche (survenue de leucémies) ont conduit à reconsidérer de manière importante les conditions sécuritaires de la thérapie génique pour améliorer le rapport risque/bénéfice</i>	2002
	X-SCID : succès thérapeutique obtenu chez 8 enfants lors d'un essai utilisant un vecteur modifié dans l'objectif de réduire le risque leucémogène ; une évaluation à long terme des complications éventuelles sera réalisée pour l'évaluation du rapport risque/bénéfice	2014
Amaurose congénitale de Leber	Démonstration d'une amélioration modérée de la fonction rétinienne pour trois patients traités	2008
Adrénoleucodystrophie	Premier succès d'une approche par thérapie génique démontrée par l'arrêt de la démyélinisation cérébrale chez deux patients traités	2009
Dystrophie musculaire de Duchenne	Essais cliniques montrant la réexpression de la protéine dystrophine après traitement par une approche de type « saut d'exon », avec une bonne tolérance clinique ; essai de phase III en cours	2009
Bêta-thalassémie	Premier succès d'une approche par thérapie génique de type <i>ex vivo</i> chez un patient, permettant l'arrêt des transfusions	2010
Hémophilie B	Démonstration du maintien d'une expression thérapeutique de facteur IX sur une période de trois ans, sans effets toxiques majeurs, chez dix patients traités par thérapie génique	2014

hématopoïétiques de patients atteints de maladies hémato-logiques monogéniques (déficits immunitaires constitutionnels, hémoglobinopathies).

Conclusion

La meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies génétiques, ainsi qu'une meilleure maîtrise des outils technologiques disponibles et une évolution positive de l'intérêt que porte l'industrie pharmaceutique aux maladies rares, permettent aujourd'hui d'avoir à nouveau une vision plus optimiste quant à la mise en place future de traitements étiologiques. Si le nombre réduit d'effectifs de patients pour de nombreuses maladies génétiques reste une difficulté lors de la mise en place d'essais thérapeutiques, l'amélioration des outils de diagnostic génétique, en particulier le séquençage à haut débit, et le développement de bases de données spécifiques

nationales ou internationales permettent aujourd'hui de mieux constituer les cohortes de patients nécessaires. Concernant le séquençage à haut débit, l'augmentation des capacités de diagnostic par l'analyse de centaines de gènes, de l'exome ou même du génome entier, a apporté de nombreux exemples récents ayant permis de proposer aux patients concernés un traitement adapté suite au diagnostic génétique précis effectué. L'enjeu est ici de permettre aux patients l'accès à des traitements déjà existants grâce à la réalisation d'un diagnostic génétique précis, en évitant toute errance diagnostique. Cette possibilité de prise en charge thérapeutique adaptée au diagnostic génétique précis entre ainsi clairement dans le domaine de la médecine personnalisée. Finalement, cette dimension personnalisée constitue bien l'une des caractéristiques des maladies génétiques et souligne à nouveau l'importance de la diversification nécessaire des approches thérapeutiques, symptomatiques et, si possible, étiologiques pour la prise en charge des patients.

ENTRAÎNEMENT 23 QCM

QCM 1

Concernant les approches thérapeutiques pour les maladies génétiques, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s) ?

- A.** Elles peuvent comporter un versant symptomatique et étiologique
- B.** Les approches thérapeutiques de type pharmacologique ne sont pas envisageables pour les maladies génétiques monogéniques
- C.** La thérapie génique est actuellement utilisée de manière courante pour la prise en charge thérapeutique des maladies génétiques
- D.** Le statut « médicament orphelin » fait partie des mesures incitatives mises en place pour favoriser la recherche et le développement d'approches thérapeutiques pour les maladies génétiques
- E.** La constitution de cohortes de patients grâce à des bases de données est un élément important pour la mise en place d'essais thérapeutiques dans le cadre des maladies génétiques

QCM 2

Concernant les approches thérapeutiques pharmacologiques pour les maladies génétiques, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s) ?

- A.** Le criblage pharmacologique à haut débit peut permettre d'identifier des composés actifs pour des maladies génétiques uniquement si le mécanisme physiopathologique est connu

- B.** Le criblage pharmacologique à haut débit peut permettre d'identifier des composés actifs pour des maladies génétiques au mécanisme physiopathologique encore méconnu

- C.** Les enzymothérapies substitutives constituent une approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'enzymes synthétiques

- D.** Plusieurs médicaments de type enzymothérapies substitutives ont déjà reçu à ce jour une AMM

- E.** L'approche de « translecture de codons stop » vise à corriger les mutations de type non-sens

QCM 3

Concernant la thérapie cellulaire, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s) ?

- A.** Elle est basée uniquement sur l'utilisation de cellules-souches embryonnaires

- B.** Elle est basée uniquement sur l'utilisation de cellules somatiques matures

- C.** Elle n'est pas envisageable chez l'Homme pour des raisons éthiques

- D.** Elle est basée sur l'utilisation à des fins thérapeutiques des capacités d'autorenouvellement et de différenciation multilignée des cellules-souches

- E.** La reprogrammation de cellules matures grâce à l'expression de différents facteurs de transcription permet d'obtenir des cellules *embryonnaires-like*, appelées cellules pluripotentes induites (IPS)

QCM 4

Concernant la thérapie génique, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s) ?

- A. Les vecteurs viraux sont des systèmes de transfert de gène développés par ingénierie génétique à partir de virus sauvages
- B. Un transgène correspond à une séquence d'intérêt qui a été intégrée de manière stable dans le génome des cellules cibles
- C. Un transgène est constitué par une séquence permettant d'exprimer un ARN messager d'intérêt
- D. L'expression ectopique d'un transgène peut avoir des conséquences toxiques
- E. Le transfert de gène *ex vivo* comporte successivement une étape de prélèvement des cellules d'intérêt chez l'individu à traiter, une étape de culture de ces cellules d'intérêt pendant laquelle est réalisé le transfert de gène, et une étape de réimplantation chez l'individu des cellules modifiées par le transfert de gène

QCM 5

Concernant la thérapie génique par modulation de l'expression, quelle(s) proposition(s) est/sont exacte(s) ?

- A. Elle est basée sur l'utilisation d'un transgène
- B. Elle consiste en une action directe sur un ARN messager exprimé par les cellules cibles
- C. Elle permet de bénéficier de la régulation endogène du niveau quantitatif et de la spécificité tissulaire de l'expression de l'ARN messager ciblé
- D. Le « saut d'exon » fait appel à l'utilisation d'oligonucléotides « antisens » pour induire de manière ciblée une modification du processus d'épissage
- E. Le phénomène d'ARN-interférence est à la base d'une approche de modulation quantitative de l'expression

► Complément en ligne

Un complément numérique est associé à ce chapitre (il est indiqué dans le texte par un picto ). Il propose une photo supplémentaire. Pour voir ce complément, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 25.1

Principe de la translecture de codons stop.

Normalement, la lecture complète d'un ARN messager au cours du phénomène de traduction permet la synthèse d'une protéine complète fonctionnelle. En cas de mutation non-sens, la traduction est interrompue prématurément, ce qui peut conduire à la synthèse d'une protéine tronquée, anormale. Par le phénomène de « translecture », induit par certaines molécules (par exemple, la gentamycine ou le PTC124-ataluren [Translarna[®]]), un codon stop formé par une mutation non-sens peut être « corrigé » : un acide aminé pris au-hasard (ou avec un certain degré de sélectivité en fonction des conditions cellulaires et du contexte de séquence génétique dans l'environnement de la mutation non-sens) sera incorporé à cet endroit au niveau de la protéine en cours de formation. Ceci permet alors la poursuite de la traduction et d'obtenir une protéine complète de longueur normale, qui peut être fonctionnelle à condition que l'incorporation de l'acide aminé « au-hasard » soit tolérée (il ne s'agit pas forcément du bon acide aminé au bon endroit de la protéine!).



La pharmacogénétique

Laurent Becquemont, Marie-Anne Lorient

PLAN DU CHAPITRE

La pharmacogénétique : définition	286
La pharmacogénétique, un peu d'histoire	286
Applications de la pharmacogénétique	286

La pharmacogénétique : définition

La pharmacogénétique est l'étude de l'influence de la variabilité physiologique de notre génome sur la réponse aux médicaments. Elle vise, par l'identification de polymorphismes fonctionnels dans le génome, à identifier des sujets non répondeurs à certains médicaments ou des sujets à risque de développer des effets indésirables et/ou à adapter au mieux la posologie de certains médicaments à chaque individu (www.pharmacogenetics.fr). La pharmacogénétique étudie classiquement des polymorphismes fonctionnels constitutionnels fréquents de notre génome. Cependant, elle se développe parallèlement très rapidement dans le cadre de l'étude des tumeurs dans laquelle les variants génétiques prédisant la réponse aux anticancéreux sont des mutations somatiques (dans la tumeur).

Les polymorphismes fonctionnels recherchés sont parfois très fréquents dans une population donnée (jusqu'à la moitié de la population). En revanche, le génotype le plus fréquent pour un même polymorphisme donné peut être différent selon l'ethnie et donc différer d'une population à une autre (ex. : population asiatique vs africaine).

La pharmacogénétique, un peu d'histoire

La notion de pharmacogénétique apparaît au milieu du siècle dernier. C'est en 1953 que le phénotype « d'acétyleur lent » de l'isoniazide est pour la première fois décrit. On découvre alors que certains individus qui présentent une neuropathie toxique attribuable à ce médicament antituberculeux éliminent très lentement ce médicament en raison d'un déficit enzymatique (N-acétylation) constitutionnel. Ces individus, encore appelés acétyleurs lents, représentent environ la moitié de la population occidentale. Quelques années plus tard, on expliquera ce déficit enzymatique par l'existence de polymorphismes fonctionnels de la N-acétyl-transférase de type 2 (NAT2), aboutissant à des modifications de la séquence protéique rendant l'enzyme inactif.

Puis, dans les années suivantes, on découvre progressivement les enzymes hépatiques impliqués dans le métabolisme des médicaments (cytochromes P450, UDP-glucuronosyl-transférases, méthyltransférase, etc.) qui, pour la plupart, présentent des polymorphismes fonctionnels

fréquents (par substitution, insertion, délétion ou duplications partielles, ou parfois du gène entier) qui modifient leur activité enzymatique.

Applications de la pharmacogénétique

Pharmacogénétique des enzymes du métabolisme des médicaments

Elle permet la prévention des effets indésirables ou la compréhension d'une réponse inadaptée (surdosage ou absence de réponse) à un médicament.

Les enzymes du métabolisme des médicaments (EMM) se divisent en enzymes de phase I, comme les cytochromes P450 (ou CYP) qui, sur les médicaments, assurent essentiellement une hydroxylation ou une déméthylation, et les enzymes de phase II, encore appelés enzymes de conjugaison, qui ajoutent un radical sur le médicament comme la glucuroconjugaison par exemple.

Les polymorphismes fonctionnels sont responsables de variations d'expression ou d'activité des enzymes. L'existence, dans la population générale, de différents allèles d'un même gène et, par conséquent, de différents génotypes, définit un polymorphisme génétique. Ils s'expriment dans la population générale sous la forme de différents phénotypes métaboliques, définissant généralement deux groupes d'individus : métaboliseurs lents (ML) (déficit d'activité enzymatique) et métaboliseurs rapides (MR) (activité normale). Cependant, l'existence de métaboliseurs ultrarapides (MUR) (activité augmentée) ou intermédiaires (MI) (activité réduite) est connue pour certaines enzymes. La fréquence des différents phénotypes est variable selon l'enzyme et, pour une même enzyme, peut dépendre de l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées.

On peut distinguer pour certains de ces EMM plusieurs phénotypes ([figure 26.1](#)) :

- les individus métaboliseurs lents, présentant en général des polymorphismes à l'état homozygote ou hétérozygote composite entraînant une perte de fonction d'un gène codant pour un EMM ; l'activité enzymatique est alors quasi nulle ;
- les individus métaboliseurs intermédiaires, en général hétérozygotes pour un polymorphisme entraînant une perte de fonction ; l'activité enzymatique est alors diminuée mais encore mesurable ;

- les métaboliseurs rapides, qui correspondent aux sujets exempts de polymorphisme (dits «homozygotes sauvages») chez qui l'activité enzymatique est normale. Ils représentent habituellement la majorité des sujets;
- les métaboliseurs ultrarapides, du fait de la présence d'un polymorphisme activateur ou d'une duplication du gène entier, ont une activité enzymatique très supérieure aux autres.

Les conséquences du polymorphisme des enzymes du métabolisme des médicaments dépendent d'une part du phénotype de l'individu et d'autre part du médicament

(tableau 26.1 et figure 26.2). Les caractéristiques à prendre en compte pour le médicament sont :

- son index thérapeutique (les conséquences cliniques seront d'autant plus importantes que l'index thérapeutique est étroit, c'est-à-dire que l'écart entre les concentrations circulantes toxiques et inefficaces est étroit);
- si le médicament est actif sous forme inchangée et inactif sous forme métabolisée (cas le plus fréquent);
- si le médicament est inactif sous forme inchangée et actif sous forme métabolisée (cas des prodrogues).

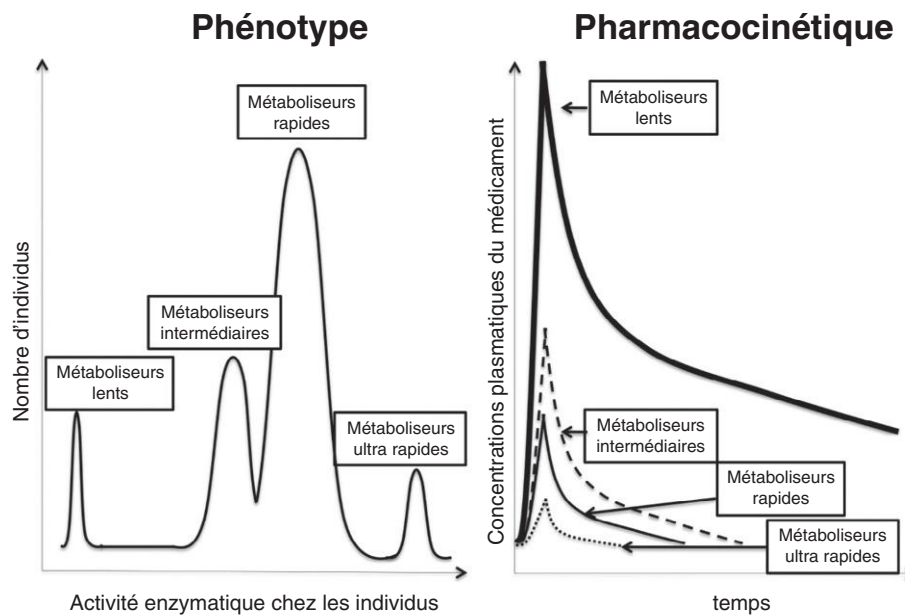


Figure 26.1

Enzymes du métabolisme des médicaments : représentation des différents phénotypes et conséquences pharmacocinétiques.

À gauche : représentation du phénotype d'une population vis-à-vis d'un enzyme du métabolisme des médicaments dont l'activité est génétiquement déterminée. À droite : conséquences pharmacocinétiques du polymorphisme fonctionnel pour un médicament éliminé par cette même voie métabolique.

Tableau 26.1. Conséquences pharmacodynamiques du polymorphisme fonctionnel d'un enzyme du métabolisme d'un médicament.

	Médicament actif sous forme inchangée, inactif sous forme de métabolite (cas le plus fréquent)				Médicament inactif sous forme inchangée, actif sous forme de métabolite (prodrogue)			
	ML	MI	MR	MUR	ML	MI	MR	MUR
Effet pharmacologique souhaité	↑	↗	↔	↓	↓	↙	↔	↑
Effet indésirable (concentration-dépendant)	↑	↗	↔	↓*	↓*	↙	↔	↑

ML : métaboliseurs lent; MI : métaboliseurs intermédiaires; MR : métaboliseurs rapides; MUR : métaboliseurs ultrarapides; ↑ : très augmenté; ↗ : modérément augmenté; ↔ : effet habituel dans la majorité de la population; ↙ : modérément diminué; ↓ : effet très diminué; * : chez ces patients il peut exister un risque élevé de résistance thérapeutique.

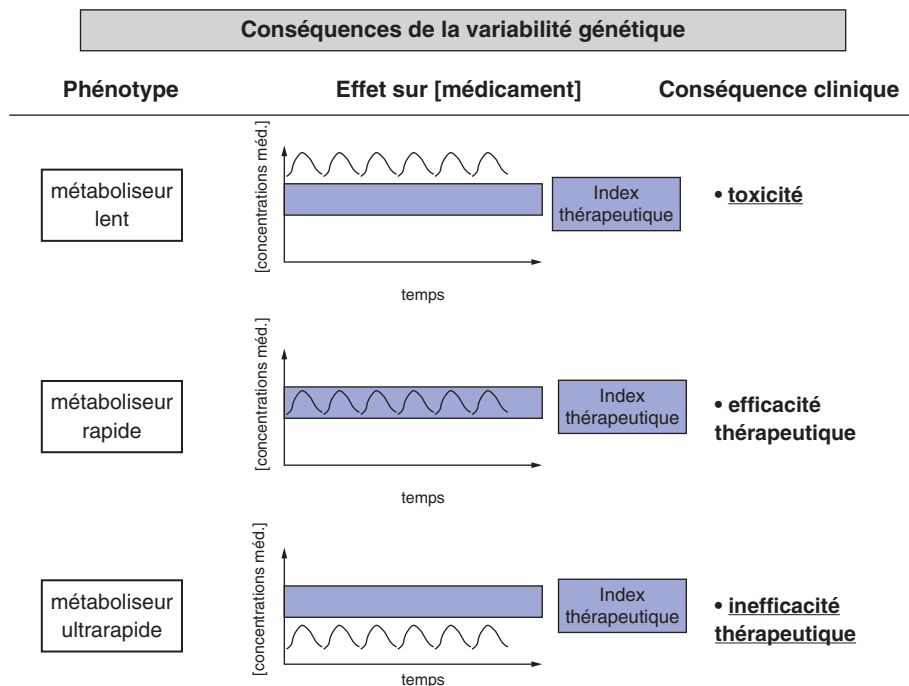


Figure 26.2

Conséquences thérapeutiques du polymorphisme fonctionnel d'un enzyme du métabolisme d'un médicament.

Les conséquences pharmacotoxicologiques le plus souvent observées sont, d'une part, chez les métaboliseurs lents, un surdosage et des effets indésirables ou une non-réponse (si prodrogue) et, d'autre part, les cas où il existe des métaboliseurs ultrarapides, une non-réponse (médicament actif sous forme inchangée) ou réponse augmentée (si prodrogue).

Les principaux médicaments pour lesquels une information pharmacogénétique est présente dans le libellé du résumé des caractéristiques produit de l'AMM figurent dans le [tableau 26.2](#). Il faut noter que certains EIG décrits ci-dessous peuvent entraîner le décès des patients.

Pharmacogénétique des accidents immunoallergiques médicamenteux

Elle permet la prévention des accidents immunoallergiques médicamenteux en fonction de certains polymorphismes de loci du système HLA (pour *human leukocyte antigen*, antigènes des leucocytes humains).

En effet, la région la plus polymorphe de notre génome correspond aux gènes du système HLA. Or il a été récemment mis en évidence que des accidents immunoallergiques médicamenteux graves, notamment cutanés,

survenaient exclusivement chez des individus porteurs d'un locus HLA spécifique (différent pour chaque médicament), possiblement en raison d'une liaison entre le médicament avec une molécule HLA donnée qui est alors présentée au système immunitaire. Le tableau 2 indique quelques médicaments anticonvulsivants, ainsi que l'abacavir, pour lequel l'AMM prévoit un test pharmacogénétique obligatoire avant de le prescrire.

Pharmacogénétique des cibles des médicaments

Elle permet la compréhension d'une réponse inadaptée (surdosage ou absence de réponse) à un médicament.

En génétique constitutionnelle

La séquence en acides aminés des cibles des médicaments (comme les récepteurs), ou leur niveau d'expression tissulaire peut varier du fait de la présence de polymorphismes fonctionnels. À ce jour, le seul exemple cliniquement pertinent en génétique constitutionnelle est celui du gène *VKORC1* codant la cible des anticoagulants oraux (AVK), un enzyme du cycle de la vitamine K dont l'inhibition est

Tableau 26.2. Exemples de médicaments pour lesquels des informations pharmacogénétiques (somatique) figurent dans l'AMM.

Médicament (DCI)	Nature/Indication	Gène cible	Information*	Conséquences
Tamoxifène (prodrogue)	Cancer du sein	CYP2D6	Non-réponse Test non obligatoire	Perte d'efficacité chez les ML
Clopidogrel (prodrogue)	Syndrome coronarien	CYP2C19	Non-réponse Test non obligatoire	Perte d'efficacité chez les ML
Codéine (prodrogue)	Douleur	CYP2D6	EIG Test non obligatoire	Surdosage opiacé chez les MUR
Voriconazole	Infection fongique	CYP2C19	EIG Test non obligatoire	Risque d'hépatotoxicité chez les ML
Eliglustat	Maladie de Gaucher	CYP2D6	Test obligatoire	Non-réponse chez les MUR Risque toxique chez les ML
Warfarine (AVK)	FA, thrombose	CYP2C9 et VKORC1	EIG adaptation dose Test non obligatoire	Risque hémorragique chez les porteurs de polymorphismes
Célécoxib (AINS)	Douleur	CYP2C9	EIG Précaution d'emploi Test non obligatoire	Risque gastroduodéal chez les ML
Isoniazide	Tuberculose	NAT2	EIG Précaution d'emploi Test non obligatoire	Risque neurologique et hépatotoxicité chez ML
Irinotécan (cytotoxique)	Cancer digestif	UGT1A1	EIG adaptation dose Test non obligatoire	Diarrhée, neutropénie chez les ML
Azathioprine et 6-mercaptopurine	Maladie de Crohn, cancer	TPMT	EIG adaptation dose Test conseillé	Neutropénie chez les ML
Capécitabine et 5-FU	Cancer	DPYD	EIG contrindication Test conseillé	Mucite orodigestive, neutropénie, aplasie chez les ML
Bocéprévir, télaprévir, peginterféron	Hépatite C	IFNL3	Non-réponse Test conseillé	Répondeurs au traitement
Rasburicase, chloroquine, dapsone		G6PD	EIG contrindication Test non obligatoire	Hémolyse en cas de déficit en G6PD
Carbamazépine	Épilepsie	HLA-B*1502 :	EIG Test conseillé	SJS (pour sujets d'origine asiatique)
Phénytoïne Fosphénytoïne	Épilepsie	HLA-B*1502	EIG Test conseillé	SJS (sujets d'origine Asiatique)
Abacavir	VIH	HLA-B*5701	EIG Test obligatoire	Réactions d'hypersensibilité

SJS : syndrome de Stevens-Johnson ; EIG : effet indésirable grave ; G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; CYP : cytochrome P450 ; NAT2 : N-acétyl transférase de type 2 ; UGT1A1 : UDP-glucuronosyl-transférase de type 1 ; TPMT : thiopurine méthyltransférase ; DPD : dihydropyrimidine déshydrogénase ; IFNL3 : interféron lambda 3.

* Test pharmacogénétique obligatoire ou non en France dans le cadre de l'AMM avant toute prescription.

à l'origine de l'activité anticoagulante des AVK. Un SNV (VKORC1 : c.-1639G> A; rs9934438) dans le promoteur du gène VKORC1 aboutit à la diminution de son expression. Chez les porteurs homozygotes (A/A) pour le SNV (15–20 % de la population occidentale et 80 % des populations asiatiques), la cible des AVK étant moins exprimée, il faut des doses d'AVK 2 à 4 fois plus faibles pour inhiber l'enzyme et obtenir ainsi le même effet anticoagulant que chez les patients non mutés. Si l'on débute avec la dose usuellement recommandée, le risque hémorragique est très important à l'initiation du traitement chez les individus ayant un génotype muté pour le gène VKORC1.

En génétique somatique

C'est principalement dans le cadre de la génétique des tumeurs que la pharmacogénétique des cibles des médicaments a toute son importance en soins; en effet, la variabilité génétique dans les tumeurs y est considérable. Les gènes codant pour de nombreux récepteurs ou protéines de voies de signalisation peuvent présenter des mutations somatiques qui conduisent à une activation échappant à toute régulation et aboutissent à la prolifération des cellules tumorales. Certaines de ces mutations sont même à l'origine du cancer, comme la translocation conduisant à un gène de fusion (BCR-ABL), connue sous le nom de chromosome de Philadelphie dans la leucémie myéloïde chronique. Un grand nombre de ces mutations dans différents

cancers (colon, poumon, cutanés, etc.) sont situées dans des récepteurs membranaires possédant une activité tyrosine kinase (ex. : EGFR) ou dans des protéines associées à ces récepteurs dans les voies de signalisations activées dans les cellules cancéreuses (ex. : protéines Ras, Raf). L'industrie pharmaceutique développe depuis la fin du siècle dernier des inhibiteurs de ces protéines mutées activées que l'on dénomme « thérapies ciblées » (par opposition aux cytotoxiques non spécifiques). Ces thérapies ciblées n'ont d'efficacité que si ces mutations activatrices de la cible sont présentes dans la tumeur ou bien si des mutations activatrices situées hors de la cible des médicaments (prédisant une non-réponse) sont absentes. La prescription de ces molécules est conditionnée par la connaissance du statut génétique de la tumeur avant la mise en route du traitement puisque la présence ou l'absence de ces mutations sont associées à la réponse ou non-réponse. Par exemple, la prescription d'un traitement par cétuximab (anti-EGFR) ne sera possible qu'en l'absence de mutation du gène KRAS dans la tumeur colique alors que la prescription d'erlotinib (inhibiteur EGFR) ne sera possible que dans les cas de tumeurs pulmonaires avec mutations activatrices du gène EGFR. Le [tableau 26.3](#) indique les principaux exemples de thérapies ciblées pour lesquels un test génétique est actuellement requis avant leur prescription. Contrairement à la pharmacogénétique constitutionnelle ([tableau 26.2](#)), la réalisation des tests génétiques somatiques est obligatoire avant la prescription du médicament.

Tableau 26.3. Exemples de médicaments pour lesquels des informations pharmacogénétiques (oncologie moléculaire) dans l'AMM conditionnent la prescription des traitements.

Médicament	Gène cible	Cancer	Information	
Géfitinib, Erlotinib	EGFR	Poumon	Répondeur Test obligatoire avant traitement	Mutation activatrice du gène EGFR
Crizotinib	ALK	Poumon	Non-répondeur Test obligatoire avant traitement	Mutation activatrice du gène ALK
Trastuzumab	HER2	Sein	Non-répondeur Test obligatoire avant traitement	Pas d'expression tumorale du gène HER2
Imatinib, dasatinib, nilotinib	BCR-ABL	Leucémie myéloïde chronique	Non-répondeur Test obligatoire avant traitement	Présence d'un gène de fusion ou mutation de résistance
Cetuximab, Panitumumab	K-RAS	Côlon	Non-répondeur Test obligatoire avant traitement	Mutations activatrices du gène K-RAS
Imatinib	c-Kit	Intestin	Non-répondeur Test obligatoire avant traitement	Mutations activatrices du gène c-Kit
Dabrafenib, vemurafenib	BRAF	Mélanome	Non-répondeur Test obligatoire avant traitement	Mutation activatrice V600E du gène BRAF

ENTRAÎNEMENT 24 QCM

QCM 1

La pharmacogénétique a pour objectif :

- A.** D'identifier des patients à risque d'effets indésirables médicamenteux
- B.** D'identifier des patients susceptibles de développer une maladie
- C.** De différencier des sujets allant répondre ou non à un traitement
- D.** D'adapter la posologie d'un médicament à des caractéristiques génétiques d'un individu
- E.** De déterminer le mécanisme d'action des médicaments

QCM 2

Parmi les propositions ci-dessous concernant la pharmacogénétique, quelles sont les réponses exactes ?

La pharmacogénétique :

- A.** Étudie en général des polymorphismes fréquents
- B.** Concerne souvent l'identification de polymorphismes fonctionnels des enzymes du métabolisme hépatique
- C.** Se pratique chez des individus qui en l'absence de médicaments ont des caractéristiques phénotypiques particulières
- D.** En étude somatique dans le cadre des tumeurs vise à identifier des patients à risque d'effets indésirables
- E.** En étude constitutionnelle des cibles de médicaments vise à identifier des patients à risque d'effets indésirables

QCM 3

Parmi les propositions ci-dessous concernant la pharmacogénétique des enzymes du métabolisme des médicaments, quelles sont les réponses exactes ?

La pharmacogénétique des enzymes du métabolisme des médicaments :

- A.** Permet d'identifier des sujets à risque d'effets indésirables pour un médicament donné
- B.** Peut entraîner des conséquences pharmacocinétiques
- C.** Permet d'adapter la posologie de certains médicaments
- D.** Permet d'identifier des sujets non répondeurs
- E.** S'applique le plus souvent au génome tumoral

QCM 4

Parmi les propositions ci-dessous concernant la pharmacogénétique des cibles des médicaments, quelles sont les réponses exactes ?

- A.** Elle concerne essentiellement la génétique des tumeurs
- B.** Elle permet d'identifier des sujets qui vont présenter un accident immunoallergique à un médicament

C. Elle peut être combinée à des tests pharmacogénétiques sur des enzymes du métabolisme des médicaments afin d'adapter la posologie de certains médicaments

D. Une variation génétique de la cible se traduit par des conséquences pharmacocinétiques

E. Elle permet d'identifier les patients dont les concentrations circulantes de médicaments seront élevées

QCM 5

Parmi les propositions ci-dessous, quelles sont celles qui sont exactes ?

A. La recherche de polymorphismes fonctionnels des enzymes du métabolisme des médicaments permet d'expliquer des événements indésirables médicamenteux d'origine immunoallergique

B. La survenue d'un sous-dosage médicamenteux brutal, alors que le patient était auparavant bien équilibré pendant une longue période sous un même traitement dont la posologie est demeurée inchangée peut être expliquée par un test pharmacogénétique

C. Des tests pharmacogénétiques HLA peuvent prédire des concentrations circulantes élevées d'un médicament (surdosage)

D. La région HLA est la plus polymorphe de notre génome

E. Dans le domaine de l'oncologie on peut pratiquer de la pharmacogénétique somatique et/ou constitutionnelle

QCM 6

Conséquences des polymorphismes fonctionnels des enzymes du métabolisme des médicaments (EMM) (indiquez les réponses vraies) :

A. La présence d'un variant nucléotidique au sein d'un gène codant un EMM est toujours associée à une baisse d'activité de l'enzyme

B. La présence de polymorphismes au sein d'un gène codant un EMM peut conduire à des phénotypes différents selon l'ethnie du patient

C. Pour certains EMM, on peut identifier des métaboliseurs lents et des métaboliseurs ultrarapides

D. Un test génétique peut permettre de prédire la réponse à un médicament

E. Les métaboliseurs lents sont toujours mauvais répondeurs aux médicaments

This page intentionally left blank

Complément ECN

PLAN DE LA PARTIE

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie chromosomique : la trisomie 21	295
Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie génétique : la mucoviscidose	309
Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie d'instabilité : le syndrome de l'X fragile	321

This page intentionally left blank

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie chromosomique : la trisomie 21

Renaud Touraine, Bénédicte de Fréminville, Damien Sanlaville

PLAN DU CHAPITRE

Incidence	296
Signes cliniques après la naissance	297
Aspects génétiques	300
Traitement	301
Dépistage prénatal	303
Conclusion	305



L'essentiel à retenir

La trisomie 21 (T21) est la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle d'origine génétique, avec une incidence en France de 1/1500 à 1/2000 naissances. En l'absence de dépistage prénatal, compte tenu de la pyramide des âges des mères, elle représenterait 1/500 naissances et environ 10 % des déficiences intellectuelles. La trisomie 21 est une anomalie chromosomique définie par la présence de trois copies de tout ou d'une partie du chromosome 21. Le seul facteur de risque reconnu est l'augmentation de l'âge maternel (1/1000 à 30 ans, 1/100 à 40 ans). Une trisomie 21 libre (95 %) résulte d'une erreur de ségrégation méiotique. Elle est « accidentelle » et ne nécessite pas d'examen chez les parents. Lorsque la trisomie 21 n'est pas libre (translocation par exemple), le caryotype des parents est nécessaire. Il identifiera, dans la moitié des cas, une anomalie équilibrée chez l'un d'eux, avec alors un risque de récurrence augmenté lors des futures grossesses. La réalisation d'un caryotype devra alors être proposée pour les autres membres de la famille.

La T21 augmente la probabilité de malformations (cardiaques, digestives, etc.) ou comorbidités (hypothyroïdie, myopie, surdité, etc.), justifiant un suivi médical systématique.

La déficience intellectuelle est le plus souvent légère à moyenne (QI > 50), permettant dans au moins la moitié des cas l'acquisition de la lecture et une certaine autonomie en milieu ordinaire. Une prise en charge précoce et durant toute la vie par un accompagnement multidisciplinaire (médical, éducatif et rééducatif, avec une attitude éducative amenant les personnes à l'autodétermination) permet d'améliorer leurs compétences allant jusqu'à l'autonomie en milieu ordinaire pour une grande part d'entre elles. Les autres vivent dans leur famille ou dans un milieu protégé. Des essais d'amélioration médicamenteuse de la cognition sont en cours dans cette population. L'espérance de vie est actuellement supérieure à 60 ans, limitée par le développement d'une démence précoce de type Alzheimer dans 30 à 50 % des cas. Il existe un dépistage prénatal non obligatoire qui doit être proposé aux femmes enceintes. Il consiste à calculer le risque de trisomie 21 fœtale, vers 12 semaines d'aménorrhée, en se fondant sur un calcul combinant la mesure de l'épaisseur de la clarté de la nuque du fœtus, le dosage des marqueurs sériques β -hCG et PAPP-A et l'âge maternel.

Ce dépistage détecte environ 85 % des fœtus trisomiques 21, mais avec une faible valeur prédictive positive, puisque, en cas de risque augmenté ($\geq 1/250$), une trisomie 21 est effectivement retrouvée dans 3 à 4 % des cas sur le caryotype fœtal.

Incidence

L'incidence de la T21 est proche de 1/1600 naissances en France. On estime qu'en absence de diagnostic prénatal, son incidence avoisinerait 1/500 naissances, du fait de l'âge plus tardif des grossesses qu'auparavant. En effet, le seul facteur de risque reconnu de T21 est l'âge maternel : environ 1/1000 naissances à 30 ans, 1/100 à 40 ans, pour les T21 libres. Il faut rappeler que le risque de T21 est le même dans toutes les populations, sans différence ethnique. Le recours au diagnostic prénatal varie selon la population, en fonction du développement du système sanitaire du pays concerné, et de paramètres non médicaux comme les convictions philosophiques ou religieuses, l'image du handicap, la législation en vigueur et les conditions d'accompagnement des personnes déficientes intellectuelles.

En pratique, la fréquence de la T21 à la naissance, même si elle a diminué, reste la première cause reconnaissable de déficience intellectuelle et l'anomalie chromosomique source de difficultés la plus fréquente en période post-natale. On estime qu'il naît 1 à 2 bébés trisomiques 21 chaque jour en France. Ceci ne devrait pas changer dans les 5 à 10 ans qui viennent, puisqu'il est peu probable que le taux de dépistage prénatal augmente significativement, sauf si le diagnostic prénatal non invasif (DPNI) (voir [chapitres 11, «Le séquençage de nouvelle génération : principe, applications en diagnostic et perspectives»](#), et [15, «Diagnostic prénatal et préimplantatoire»](#)), introduit récemment dans certaines indications de risque augmenté (sans prise en charge par la Sécurité sociale), se généralise, avec remboursement. Ce taux dépend aussi du choix qu'a le couple de réaliser ou non le dépistage et de recourir ou non à l'interruption médicale de grossesse (IMG). En France, lorsqu'une T21 est diagnostiquée *in utero* ou suspectée, 90–95 % des couples demandent une interruption médicale de grossesse (IMG). Dans d'autres pays, anglo-saxons ou nordiques en particulier, une plus grande proportion de couples décide de poursuivre la grossesse (60–80 % d'IMG).

Du fait du dépistage prénatal, deux situations existent majoritairement :

- les enfants dont le diagnostic ou la suspicion a été porté pendant la grossesse ;
- les enfants n'ayant pas eu de dépistage ou qui sont des « faux négatifs » du dépistage : beaucoup n'ont pas de malformation.

Signes cliniques après la naissance

Les symptômes les plus constamment rencontrés sont l'hypotonie, la dysmorphie faciale, visibles dès la naissance, et la déficience intellectuelle.

À la naissance

- L'hypotonie est un des signes les plus constants, mais elle peut être modérée, plus particulièrement chez les Africains. Le réflexe de Moro peut être absent.
- Des signes morphologiques évocateurs (voir [chapitre 13, «Génétique clinique; examen de l'enfant porteur d'anomalies du développement»](#)), dont les plus fréquents en période néonatale sont :
 - profil plat;
 - fentes palpébrales obliques en haut et en dehors;
 - pavillons des oreilles petits et ronds;
 - nuque plate avec excès de peau;
 - hyperlaxité articulaire et cutanée;
 - brachymésophalangie des 5^{es} doigts : clinodactylie;
 - pli palmaire transverse unique (2/3 des cas);
 - espacement accru entre orteil I et II et une plante des pieds plissée.

On peut aussi noter une microcéphalie modérée avec un crâne rond, un petit nez en boule, des taches de Brushfield sur l'iris, une tendance à la protrusion de la langue qui est plicaturée, des mains larges et courtes avec une peau redondante, des doigts courts, un livedo.

Complications et évolution

L'hypotonie et l'hyperlaxité diminuent mais persistent toute la vie. L'hypotonie participe au retard des acquisitions motrices mais n'en est pas la seule cause.

Les personnes T21 sont sensibles à la douleur, mais leur perception est plus lente et moins précise. Ceci, associé à leur moins bonne expression, fait que les personnes T21 se plaignent moins, ont des difficultés à exprimer ce qu'elles ressentent et à localiser précisément le problème. Il faut donc rechercher de façon systématique et régulière les complications les plus fréquentes, dont le traitement est le plus souvent le même que pour les personnes ordinaires. Il faut en particulier rechercher des troubles du comportement, une dégradation de l'état général, une cassure staturo-pondérale, un repli, des refus, des troubles du comportement...

Les recommandations de prise en charge, publiées avec le soutien de l'association Trisomie 21 France, sont présentées dans le [tableau 27.1](#).

Un certain nombre de complications médicales, citées ci-dessous, sont plus fréquentes que dans la population générale, ceci à tous les âges de la vie, sans qu'aucune ne soit pathognomonique de la T21.

Malformations

Certaines malformations sont plus fréquentes :

- cardiaques (30 à 40 % des cas). La plus commune est le canal atrioventriculaire (CAV), suivie par la communication interventriculaire (CIV), la communication interauriculaire (CIA), la tétralogie de Fallot et la persistance du canal artériel. Elles sont la première cause de mortalité dans l'enfance;
- digestives (10 %) : atrésie duodénale, atrésie de l'œsophage, maladie de Hirschsprung (mégacôlon aganglionnaire), pancréas annulaire, atrésie anale;
- rénales : malformations banales (reflux vésico-urétéral, syndrome de la jonction, duplications), parfois hypospade;
- les malformations cérébrales sont rares;
- malformations de l'oreille moyenne et interne et cataracte congénitale sont possibles.

Développement psychomoteur et comportement

La déficience intellectuelle est légère (QI : 55 à 70) à modérée (QI : 40 à 55). La distribution du quotient intellectuel (QI) suit une courbe gaussienne : le QI moyen est autour de 50, avec un large écart : de 20 à 80. On peut observer donc des patients sans déficience et d'autres atteints de déficience sévère. On estime qu'environ la moitié des personnes porteuses de T21 sont capables d'accéder à la lecture et l'écriture et à une assez bonne autonomie.

Il y a plus de troubles du comportement que dans la population générale, mais moins que chez les autres personnes ayant une déficience intellectuelle. Ces troubles du comportement doivent, avant tout diagnostic psychiatrique, être considérés comme un mode d'expression d'une pathologie somatique. L'observation du type de trouble et des circonstances dans lesquels il survient et se répète permet dans bon nombre de cas de découvrir une pathologie ignorée ou une frustration dans la communication. Il peut s'agir aussi d'une expression d'une dépression. Des traits autistiques sont plus fréquents que dans la population générale (3 % vs 0,8 %).

Croissance et endocrinologie

Il y a fréquemment un retard de croissance intra-utérin tardif, n'attirant habituellement pas l'attention des obstétriciens. Ensuite, la croissance se poursuit généralement entre -2 et -3 DS avec une taille finale d'environ 160 cm chez l'homme et 145 cm chez la femme.

Tableau 27.1. Trisomie 21 : suivi médical.

	1–12 mois	1–3 ans	3–10 ans	Adolescence	Adulte
Examen clinique et neurologique	Tous les 2 mois	2/an	1/an	1/an	1/an
Poids/taille/diététique	Tous les 2 mois	2/an	2/an	2/an	Surveillance poids
Écho cardiaque	Si non fait à la naissance	*	*	*	Écho + ECG* ou 1/5 ans
ORL, audition	À 6 mois et 1 an	1/an	1/an	* ou à 1–3 ans	* ou à 1–3 ans
Apnées du sommeil	*	*	*	*	*
Ophtalmologie	Naissance et 9 mois	1/an	1/an	1/an	1/an
Thyroïde	À 6 mois et 1 an	1/an	1/an	1/an	* à 1/3 ans
Diabète	*	*	*	1/2 ans	* à 1/2 ans
Hygiène dentaire et soins (dentiste)		1/an	2/an	3/an	3/an
Développement orofacial (dentiste et/ou orthodontiste)	Entre 6 mois et 1 an #	1/an §	Vers 4 ans puis selon avis §	Vers 12 ans puis selon avis §	
Maladie cœliaque	À 6 mois	*	*	*	* à 1/3 ans
Orthopédie	*	*	*	*	* à 1/5 ans
RX atlas-axis			À 6 ans	À 12–13 ans	*
Gynécologie				1/2 ans	* à 1/2 ans
Prise en charge paramédicale	Oui vers 3 mois	Oui	Oui	Oui	Oui par périodes

* : selon la symptomatologie ou devant une baisse de l'état général ou une perte des acquis.

AO : calcul de l'âge osseux.

: consultation d'information.

§ : en l'absence de besoins particuliers déjà identifiés.

Il y a fréquemment une obésité dont la prise en charge, après élimination d'une cause médicale, doit porter à la fois sur la nutrition, l'activité physique, la rééducation éventuelle de la mastication (et de la déglutition), l'hygiène et les soins dentaires, l'identification d'autres sources de plaisirs et le soutien psychologique.

Les atteintes thyroïdiennes sont plus fréquentes tout au long de la vie des personnes T21, généralement hypothyroïdie auto-immune, parfois maladie de Basedow. Le dosage des hormones thyroïdiennes doit être systématique et régulier, sans attendre la survenue de signes cliniques.

Le diabète sucré est également plus fréquent, parfois de type 2, plus souvent insulino-dépendant de type auto-immun.

La puberté a lieu généralement à la période habituelle, mais la ménopause tend à être avancée.

La fertilité est diminuée dans la T21, surtout chez l'homme, mais on manque de données objectives. Au moins quatre cas de paternité et plusieurs maternités ont été décrits. Une contraception est donc à mettre en place si besoin. On privilégiera, quand le degré d'autonomie le permet, une pilule contraceptive orale au lieu d'un disposi-

tif sous-cutané de type Nexplanon®, qui risque d'accentuer le surpoids et entraîne un *spotting* mal vécu. Le stérilet est également utilisable, en particulier le petit stérilet pour nulipare au cuivre NT380 short.

Hématologie et cancérologie

Une polyglobulie à la naissance n'est pas rare, elle est transitoire.

Environ 1 à 3 % des enfants T21 développent avant l'âge de 4 ans une leucémie aiguë mégacaryocytaire (LAM7), souvent précédée d'une prolifération myéloblastique durant les premiers mois. Cette prolifération, généralement transitoire (parfois asymptomatique), concerne environ 10 % des nourrissons T21. La LAM7 est 500 fois plus fréquente dans la T21 que dans la population ordinaire. Elle répond assez bien au traitement chimiothérapique. Le risque d'autres leucémies est également augmenté et le profil des tumeurs solides est différent de la population générale (par exemple plus de cancers du testicule, de rétinoblastome ou de cancer du foie, moins de cancers du poumon, du sein ou de neuroblastome).

Immunologie et infectiologie

Il existe un excès d'infections banales, bronchopulmonaires ou ORL, en particulier les otites. La grippe et les infections à virus respiratoire syncytial (VRS) peuvent être plus sévères. Le plus souvent, aucun déficit immunitaire n'est avéré, mais il n'est pas rare de trouver des anomalies sur le bilan immunitaire (fréquence de taux bas de certains lymphocytes ou de certaines sous-classes d'immunoglobulines).

ORL

Le risque augmenté d'otites a déjà été mentionné. Elles sont souvent séreuses, favorisées par l'étroitesse de l'oreille moyenne et de la trompe d'Eustache qui est aussi hypotonique. Une baisse auditive est un risque tout au long de la vie et doit impérativement être contrôlée régulièrement. Il peut s'agir aussi de surdités de perception. Les surdités liées à l'âge peuvent être plus précoces.

Apnées du sommeil

Elles sont rapportées chez 30 à 50 % des personnes T21, tant chez l'adulte que l'enfant ; parfois d'origine centrale, mais plus souvent obstructives, elles nécessitent un dépistage régulier. Un bilan ORL est nécessaire pour poser l'indication d'adénoïdectomie ou d'amygdalectomie. L'hypotonie orolaryngée et l'obésité sont aussi des facteurs favorisant l'obstruction. Pour les apnées obstructives, l'indication d'appareillage avec pression positive continue nocturne peut s'avérer nécessaire : elle est en général assez bien acceptée et réduit la fatigue et l'endormissement diurne.

Orthopédie

L'hyperlaxité articulaire est le principal problème orthopédique de la T21. Elle peut être responsable d'une scoliose, d'une luxation de la hanche, de *genu valgum*, d'instabilité fémoropatellaire, de pieds plats et d'*hallux valgus* ou *varus*. L'instabilité de la charnière cervico-occipitale est classique mais heureusement les complications neurologiques (compression médullaire cervicale) sont peu fréquentes (1 % des personnes T21). Cette instabilité de C1/C2 est recherchée sur des clichés dynamiques de profil, mais aucune étude n'a montré de corrélation entre l'instabilité C1-C2 mesurée par la distance C1-odontoïde et le risque ultérieur de myélopathie cervicale : une radiographie normale n'est donc pas une garantie. On recommande au moins 1 série de radiographies dynamiques entre 5 et 15 ans, répétées à 5 ans d'intervalle (le risque avant l'âge de 5 ans est extrêmement faible), surtout si l'on envisage des activités sportives et avant une anesthésie générale. Le suivi clinique

des personnes âgées T21 montre une incidence importante d'arthroses cervicales, de malformations vertébrales. On peut également trouver un canal cervical étroit pouvant parfois nécessiter une intervention chirurgicale.

Neurologie

Le risque d'épilepsie est augmenté, en particulier celui de syndrome de West chez le nourrisson (une information doit être faite aux parents) et d'épilepsie généralisée à l'âge adulte. Après 35 ans, l'apparition d'une épilepsie peut être le premier signe d'une démence de type Alzheimer débutante. Elle peut aussi survenir au cours de l'évolution de celle-ci.

Ophtalmologie

Les troubles de réfraction sont fréquents. Le strabisme doit être traité (rééducation orthoptique ou chirurgie). Il y a plus de cataractes congénitales, mais aussi de cataractes séniles de survenue plus précoce. L'incidence du kératocône est augmentée. Un suivi régulier est indispensable toute la vie.

Stomatologie

L'étage moyen de la face est moins développé. Combinées avec l'hypotonie et une éruption dentaire souvent retardée et anarchique, ces anomalies conduisent à une perturbation précoce de l'oralité (suction, mastication, déglutition). L'hypotonie linguale et l'étroitesse buccale donnent une impression de macroglossie et entraînent un prognathisme relatif. La rééducation orthophonique spécialisée avec des stimulations neurosensorielles précoces permet d'améliorer la tonicité buccofaciale. Il peut exister en outre des agénésies dentaires et des anomalies morphologiques des dents. Enfin, le déficit immunitaire relatif (associé peut-être à des particularités des muqueuses) favorise les parodontopathies. Une bonne hygiène dentaire dès la petite enfance permet de les éviter, ainsi que la chute prématurée des dents qui en découle chez l'adulte). Les caries, les aphtes, la perlèche sont d'autres complications fréquentes.

Gastroentérologie

Le reflux gastro-œsophagien (RGO) est très fréquent chez l'enfant. Il favorise l'inflammation du carrefour aérodigestif et les apnées du sommeil, les surinfections bronchiques, etc. Il faut y penser aussi chez l'adulte et le sujet vieillissant. Il peut exister une achalasie, résultant d'une dysmobilité œsophagienne. La maladie de Hirschsprung et l'intolérance au gluten sont d'autres complications classiques dans la T21. La constipation est fréquente, parfois en lien avec une hypothyroïdie.

Dermatologie

La peau est sèche avec, souvent, des lésions de folliculite. L'élastome serpiginieux perforant est une complication rare. Les pathologies d'origine auto-immune, comme la pelade et le vitiligo (plus rarement), sont également plus fréquentes que dans la population ordinaire.

Vieillesse et espérance de vie

La durée de vie des personnes porteuses de T21 a nettement augmenté ces 50 dernières années. Actuellement plus de 90 % dépassent l'âge d'un an et la médiane de survie est supérieure à 55 ans. Elle reste toutefois inférieure à celle de la population générale du fait d'une mortalité augmentée, principalement liée aux malformations cardiaques, à la fragilité face aux infections et à la démence précoce. Il existe un vieillissement prématuré de tous les tissus. Ainsi, l'arthrose peut être présente dès 25 ans. Le déclin cognitif physiologique apparaît plus précoce que chez les personnes ordinaires. Il est d'origine multifactorielle. L'impact d'une vie sociale et professionnelle moins riche est certain. Entretenir les acquis et continuer à en développer de nouveaux est important à l'âge adulte.

Tous les T21 présentent des lésions histologiques cérébrales d'Alzheimer (plaques et dégénérescence neurofibrillaire) à partir de 30 ans. Si les lésions sont constantes, les manifestations démentielles ne surviennent que chez 30 à 50 % des personnes trisomiques de plus de 35 ans. Les plaques séniles et les manifestations cliniques d'Alzheimer sont certainement en rapport avec la surexpression du gène *APP* codant pour la protéine β -amyloïde, porté par le chromosome 21. La surexpression d'autres gènes du chromosome 21 pourrait avoir également un rôle. Le diagnostic de démence est moins aisé que dans la population ordinaire du fait du déficit cognitif préexistant, mais il est réalisable grâce à des outils spécifiques.

En pratique, en cas de déclin, de repli, d'épilepsie tardive, surtout après 30–35 ans, il faut exclure toutes les affections traitables avant de considérer qu'une démence en est l'origine. Les principales étiologies de ces déclins secondaires sont : une atteinte visuelle ou auditive, une dysthyroïdie, des apnées du sommeil, une maladie coéliqua, une carence en fer ou en certaines vitamines (B12, acide folique), une lésion réduisant la mobilité et causant une douleur qui n'est souvent pas verbalisée mais exprimée par des troubles du comportement (fracture, compression nerveuse), un hématome sous-dural et des troubles psychiatriques, dépression en particulier.

En cas de démence avérée, les médicaments cholinergiques ont, comme dans la population générale, une petite

efficacité; mais ils doivent ici être utilisés à faibles doses, leurs effets secondaires étant plus marqués. Les stratégies d'accompagnement sont similaires à celles mises en œuvre pour les personnes démentes non trisomiques.

Aspects génétiques

Le diagnostic de T21 repose sur le caryotype (voir [chapitre 6, «Cytogénétique conventionnelle»](#)), réalisé sur les lymphocytes obtenus par une prise de sang ou des cellules fœtales (villosités chorales ou amniocytes). Comme pour tout examen de génétique, le prélèvement doit être accompagné d'une prescription médicale signée, du consentement de la personne ou de ses parents ou de son tuteur et de l'attestation de conseil génétique signée par le médecin prescripteur.

Mécanisme

- 95 % : T21 libre
47,XY,+21 ou 47,XX,+21
Le plus souvent homogène, rarement en mosaïque (2 % des cas).
- 5 % : T21 non libre
C'est une translocation robertsonienne dans 95 % des cas.
 - 60 % : translocation entre les grands acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15) et le chromosome 21. Deux fois sur trois, il s'agit d'une translocation (14;21). Dans 50 % des cas c'est une translocation *de novo*.
Exemple de caryotype : 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21
 - 40 % : translocation entre les petits acrocentriques (chromosomes 21,22) et le chromosome 21. Dans 80 % des cas, il s'agit d'une translocation (21;21). Dans 95 % des cas c'est une translocation *de novo*.
Exemple de caryotype : 46,XY,der(21)(21;21)(q10;q10),+21
- **Exceptionnellement c'est une T21 partielle** résultant de la malségrégation d'une translocation réciproque parentale impliquant le chromosome 21 ou d'une aneusomie de recombinaison d'une inversion du 21 présente chez un des parents.

Conseil génétique (voir chapitre 12, «Conseil génétique»)

Pour un couple ayant un enfant (ou un fœtus) trisomique 21, l'étude du caryotype du cas index permet de préciser l'origine de cette trisomie.

T21 libre et homogène ou T21 libre et en mosaïque

L'origine est majoritairement « accidentelle » : c'est un problème de non-disjonction méiotique ou plus rarement mitotique (post-fécondation). La très grande majorité des cas est prézygotique, c'est-à-dire avant la fécondation. Il y avait deux chromosomes 21 au lieu d'un seul, soit dans l'ovule (90 % des cas), soit dans le spermatozoïde. La majorité des T21 provient d'une non-disjonction méiotique maternelle lors de la première mitose de méiose.

Le risque de récurrence est de 1 % avant l'âge de 40 ans, égal au risque de l'âge maternel ensuite. Cet excès de risque s'explique par les rares cas de mosaïque germinale de T21 chez un des deux parents et, peut-être, par des facteurs favorisant les non-disjonctions. La réalisation du caryotype des parents n'est pas préconisée.

T21 non libre (par translocation ou inversion...)

Dans ce cas, il est indispensable de vérifier les caryotypes parentaux. Dans la moitié des cas, l'anomalie est survenue *de novo* pendant la gamétogenèse. Le risque de récurrence est de 1 %, comme pour la T21 libre et homogène.

Dans les autres cas, l'un des deux parents a une anomalie chromosomique équilibrée impliquant le chromosome 21. Le risque de récurrence est variable selon l'anomalie et le sexe du parent porteur de cette anomalie, en général, de l'ordre de 5 à 15 % (et 100 % dans les exceptionnelles translocations robertsoniennes 21-21). En cas d'anomalie équilibrée chez un parent, il faut poursuivre l'exploration de la branche familiale concernée afin d'identifier les autres porteurs.

L'augmentation du risque de récurrence après la naissance d'un enfant trisomique, quelle qu'en soit l'importance, permet aux parents, s'ils le souhaitent, d'obtenir une vérification du caryotype fœtal (en général par amniocentèse si le risque de récurrence est faible), ou sur villosité chorale (en cas de translocation parentale).

Pour une personne porteuse de trisomie 21

Il n'y a pas de différence phénotypique selon l'anomalie chromosomique, sauf dans les mosaïques faibles, (moins de 10 %) et pour les T21 partielles.

Les hommes T21 ont probablement une fertilité réduite, bien qu'il n'y ait pas d'études en population. Quelques grossesses ont été rapportées chez les compagnes d'hommes

T21. La fertilité chez les femmes T21 est réduite mais des grossesses sont possibles et plusieurs ont été décrites.

Le risque de T21 est de l'ordre de 30 % et non 50 % chez les femmes T21 (pertes embryonnaires précoces). Chez les hommes, les rares cas décrits n'avaient pas eu d'enfant T21.

Traitement

La prise en charge précoce (kinésithérapie, psychomotricité, orthophonie, accompagnement éducatif), commence autour de trois mois par la kinésithérapie motrice, la psychomotricité et l'orthophonie. Cet accompagnement est à poursuivre, en vue de la meilleure autonomie et insertion sociale possible, en milieu ordinaire.

Voir le site de Trisomie 21 France : www.trisomie21-france.org

Accompagnement kinésithérapique

L'objectif est d'accompagner l'enfant dans son développement neuromoteur et de prévenir les déficits et anomalies de statique qui apparaissent en l'absence de prise en charge du fait de l'hypotonie et de l'hyperlaxité.

Il faut solliciter la pratique régulière d'activités physiques qui seront un relais ensuite vers la kinésithérapie.

La kinésithérapie est souvent arrêtée à l'âge de la marche alors que les bénéfices de la poursuivre sont majeurs sur la tonicité et la motricité globale, la motricité fine, l'acquisition de l'équilibre, la tonification buccofaciale.

Accompagnement psychomoteur

L'objectif est d'aider l'enfant à percevoir et connaître son corps pour ses conduites motrices, mais aussi pour ses conduites expressives. Une attention particulière est portée sur l'adaptation de l'enfant au sein de la collectivité, sa compréhension des situations sociales, des jeux et sa capacité à construire sa place.

Un travail peut être maintenu chez l'adolescent, soit à partir d'objectifs d'autonomie qu'il peut formuler, soit sous la forme d'un accompagnement plus global à cette période qui nécessite une réappropriation de l'image du corps qui subit des transformations importantes et qui correspond souvent à une nouvelle confrontation à la perception de la différence.

Accompagnement orthophonique

L'objectif global de l'éducation précoce est d'accompagner le très jeune enfant dans la mise en place de la communication, de renforcer le tonus buccal et d'améliorer l'oralité très perturbée par l'hypotonie et les particularités de la dentition. Les problèmes de mastication et de déglutition bénéficient de cette prise en charge précoce (avant l'âge de 1 an).

L'orthophoniste est là aussi pour aider les parents à mieux interagir avec cet enfant dont l'hypotonie atténue les signes de communication.

Il existe une problématique langagière spécifique à la T21, notamment des difficultés d'articulation concourant à une moindre intelligibilité de la parole, non corrélée au niveau de compréhension, généralement meilleur.

L'orthophoniste peut utiliser conjointement différents systèmes et méthodes d'aide à la communication, basés sur les stimulations sensorielles (le toucher, la vue, l'ouïe, etc.), sur la gestuelle, les mimiques et l'imitation. L'utilisation d'outils tels que le Français signé et le Makaton (signes et pictogrammes) sont recommandés et permettent un accès plus rapide à la communication chez ces personnes.

Accompagnement psychologique

L'accompagnement psychologique et social de la personne trisomique s'organise autour de deux axes complémentaires : la famille et la construction de la personne.

La famille

Comme pour tout enfant, elle constitue « le » cadre primordial de développement de l'enfant trisomique. Dès l'annonce du diagnostic (en période prénatale ou en période postnatale), la famille aura à entamer le cheminement souvent long qui lui permettra de se réorganiser pour donner à « son » enfant avec T21, la place qui lui convient dans la structure familiale. Le temps de l'annonce est un moment très important. Il faut laisser une perspective positive aux parents d'autant plus que les enfants avec T21 sont des enfants qui font des acquisitions et progressent.

Certains dispositifs d'accueil mis en place par des associations peuvent constituer une aide supplémentaire, mais aussi les groupes de parole des parents et les « groupes fra-

trie » car la famille au sens large est touchée par la naissance d'un enfant différent.

La construction de la personne

Pendant l'enfance et l'adolescence, puis à l'âge adulte, des évaluations objectives et répétées des compétences, des difficultés et des habiletés sociales peuvent aider la personne T21, ainsi que sa famille et ses éducateurs, à mieux connaître ses points forts et ses points faibles dans le but de construire son projet de vie, en milieu ordinaire ou adapté, et d'aider les familles dans la prise de risque que cela implique.

La T21 ne préserve pas des aléas de l'existence. Il existe pour les personnes trisomiques, comme pour nous tous, des moments où l'individu seul a du mal à faire face et où l'écoute et le soutien d'un professionnel deviennent particulièrement nécessaires. Moins aptes que d'autres à exprimer leur malaise, le mal-être des personnes trisomiques est trop souvent ignoré.

Accompagnement éducatif

L'accès à la crèche, à l'école, au centre social et de loisir, au club sportif ou à la piscine ne va pas toujours de soi. Celui à la formation professionnelle et au travail en milieu ordinaire reste encore marginal. L'accompagnement éducatif doit alors se centrer sur les milieux de vie de la personne en l'accompagnant, en donnant de l'information (et de la formation) aux professionnels de ces lieux comme aux autres usagers.

Il faut favoriser le développement de relations sociales avec des pairs (porteurs de T21 ou d'autres déficiences) et des personnes ordinaires.

À l'adolescence un accompagnement autour de la vie affective et sexuelle se révèle important.

La notion de parentalité doit également faire l'objet d'un accompagnement à l'âge adulte pour permettre aux personnes de se construire dans leur globalité.

Les enfants T21 ont, comme les autres enfants, un accès de plein droit à l'école ordinaire (loi du 11 février 2005). Il existe désormais sur le territoire national des dispositifs de scolarisation et d'accompagnement qui permettent des parcours diversifiés en milieu ordinaire. Cette scolarisation s'effectue avec un projet éducatif et un accompagnement adapté, social et psychologique. N'oublions pas que les apprentissages ne se limitent pas à l'âge scolaire, il est encore possible d'apprendre à lire après 18 ans.

Autodétermination

Permettre à une personne avec T21 d'élaborer et d'exprimer ses choix personnels puis de les mettre en œuvre est un enjeu éducatif majeur qui nécessite un accompagnement particulier. La loi de rénovation sociale et médico-sociale du 2 janvier 2002 implique activement la personne porteuse de handicap dans son projet d'accompagnement et sollicite le recueil de son consentement éclairé pour les décisions la concernant. La loi pour l'égalité des chances du 11 février 2005 introduit dans la constitution du dossier pour la maison départementale des personnes handicapées (MDPH), l'écriture du projet de vie qui devrait être bâti sur les souhaits de la personne. Ceci requiert certaines aptitudes : capacité à formuler des envies, des préférences, à faire des choix, à prendre des décisions, à résoudre des problèmes et à se fixer des objectifs.

L'action éducative auprès des personnes handicapées doit contribuer à mettre en place ces comportements d'autodétermination, concept porté par des mouvements de personnes handicapées et par leurs accompagnants depuis 1972 (Québec, Belgique). Les éducateurs et accompagnants deviennent des partenaires, avec la famille, de la construction personnelle pour favoriser l'acquisition des comportements de l'autodétermination.

- **L'autonomie** : agir en accord avec ses intérêts, ses préférences et ses capacités, de manière indépendante, sans influence extérieure exagérée.
- **L'autorégulation** : pouvoir formuler un problème, envisager les différentes pistes, prendre une décision, s'ajuster, s'adapter, tout ceci impliquant la possibilité de prendre des risques.
- **L'appropriation psychologique** : conscience que l'on fait les choses pour soi et que l'on a une influence sur sa vie; sentiment d'avoir les compétences nécessaires pour atteindre les objectifs souhaités, être motivé par l'attente de solutions positives.
- **L'auto-actualisation ou réalisation personnelle** : processus par lequel une personne apprend à tirer profit de la connaissance de ses forces et de ses faiblesses afin d'optimiser son développement personnel.

L'accompagnement éducatif consiste alors à ne pas proposer en permanence des activités, à ne pas remplir le temps mais, au contraire, à aider la personne à exprimer ses choix, à les argumenter et à l'amener à imaginer les manières possibles de les réaliser. Le partenariat doit aussi être en direction de la famille au sens large pour une cohérence autour du projet et pour accompagner l'angoisse liée à la prise de risque.

Les maisons départementales des personnes handicapées (MDPH)

Les MDPH sont maintenant englobées avec le secteur de la dépendance dans les maisons départementales de l'autonomie.

La MDPH est un lieu unique créé par la loi pour l'égalité des droits et des chances, la participation et la citoyenneté des personnes handicapées, du 11 février 2005, chargée de l'accueil et de l'accompagnement des personnes handicapées et de leurs proches dès l'annonce du handicap et tout au long de la vie. Les MDPH constituent un réseau local d'accès à tous les droits, prestations et aides pour les personnes en situation de handicap.

Ainsi elles sont chargées :

- de l'orientation des personnes handicapées (enfant ou adulte) vers les services et établissements médico-sociaux (CAMSP, SESSAD, IME, etc.) vers la scolarisation (CLIS, ULIS collège, ULIS lycée), vers la professionnalisation (services d'aide par le travail ou ESAT);
- de l'attribution de la reconnaissance de la qualité de travailleur handicapé (RQTH);
- de l'attribution de l'ensemble des aides et des prestations (carte d'invalidité, de stationnement, allocations pour enfant ou adulte handicapé, tierce personne, prestation de compensation du handicap ou PCH, etc.);
- d'évaluer les besoins des personnes en fonction de leur projet de vie.

Dépistage prénatal (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »)

La France est le pays où le dépistage prénatal de la T21 est le plus organisé. Les médecins doivent informer les patientes de la possibilité d'un dépistage de la T21, pris en charge par l'assurance maladie, mais qui n'est donc pas obligatoire. Le dépistage combiné est basé sur l'âge maternel, la clarté nucale au premier trimestre et le dosage des marqueurs sériques au premier ou au deuxième trimestre.

Les performances du dépistage sont peu satisfaisantes, se traduisant par une valeur prédictive positive basse et un taux relativement élevé de faux négatifs (15–20 %).

Le seuil appliqué permet de détecter plus de 80 % des fœtus trisomiques au prix de 5 % d'amniocentèses. Le challenge majeur tient aux risques de morts fœtales induites (évaluées entre 0,5 % et 1,5 % soit 200 par an en France), dont la majorité survient pour des fœtus non atteints.

Les marqueurs sériques (MS) du risque de T21

Ce sont des substances dosées dans le sang maternel dont la distribution du dosage est différente selon que le fœtus a une T21 ou pas. Par exemple, le dosage de la fraction β de l'hCG tend à être plus élevé lorsque le fœtus a une T21. Mais il n'y a pas de seuil permettant de séparer les fœtus T21 des autres (il y a chevauchement des courbes). Il en est de même pour les autres dosages.

- Marqueurs du premier trimestre (entre 11 SA et 13 SA + 6 jours) : β -hCG et PAPP-A.
- Marqueurs du deuxième trimestre (entre 14 SA et 17 SA + 6 jours) : hCG ou β -hCG et α -FP (et éventuellement estriol).

Ces MS ne sont pas faits pour dépister les autres anomalies chromosomiques. Utilisés seuls les MS dépistent environ 60–66 % des fœtus T21, mais ont beaucoup de faux positifs et font proposer une amniocentèse à 1 grossesse sur 10 à 12 avec une T21 dans seulement 1 % des cas.

La clarté de la nuque du fœtus

Petite zone de densité liquidienne entre la peau et les plans profonds musculosquelettiques mesurés sur l'échographie du premier trimestre, sur une coupe de profil. Elle est physiologique et tend à diminuer après le premier trimestre et à rentrer dans la norme même chez les fœtus T21. Plus elle est grande, plus il y a de risque que le fœtus ait une pathologie (anomalie chromosomique dont T21 mais aussi syndrome malformatif ou éventuellement infection).

On observe des faux positifs chez des fœtus avec une clarté augmentée sans pathologie et qui iront bien, et des faux négatifs avec des fœtus T21 à clarté nucale fine : là encore il n'y a pas de seuil discriminant. Des courbes permettent d'obtenir, selon la mesure de la clarté et la taille du fœtus (longueur crâniocaudale [LCC]), un chiffre d'augmentation (ou de diminution) du risque de T21.

En pratique

On informe (la femme enceinte/le couple décide) de la possibilité de la réalisation d'un calcul de risque de T21 selon les résultats des marqueurs, de la mesure de la clarté de la nuque et de l'âge maternel. Il a en effet été montré que cette stratégie, tout en maintenant le nombre de fœtus T21 détectés (de l'ordre de 85 %), diminuait le taux de faux positifs, passant de près de 10 % à 5 % (dépistage combiné du premier trimestre).

On parlera de dépistage combiné (mesure nuque T1 + MS T1 et âge maternel) et de dépistage séquentiel (mesure nuque T1 + MS T2 et âge maternel). Depuis 2009, c'est le dépistage combiné qui est recommandé.

Pour la réalisation de ce dépistage :

- le médecin qui mesure la nuque à l'échographie du premier trimestre doit être validé pour cette mesure (plusieurs organismes ou associations ont mis en place cette validation) et être enregistré auprès d'un réseau de périnatalité, afin que le résultat soit pris en compte;
- le laboratoire qui dose les MS doit également être habilité;
- enfin, la patiente doit signer un consentement pour le dosage des MS, contresigné par le médecin prescripteur.

Le seuil de positivité a été placé à 1/250 : au-dessus de 1/250, on considère que le fœtus est à risque accru de T21 et la réalisation d'un caryotype fœtal est proposée. Dans ce cas, avec le dépistage combiné ou séquentiel, il y a une probabilité de l'ordre de 3–4 % de trouver une T21 (1/27). En dessous de 1/250, le risque de T21 est considéré comme faible chez le fœtus.

Le diagnostic non invasif sur sang maternel (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »)

Depuis peu, certains laboratoires proposent une recherche sur l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Il s'agit donc d'une méthode non invasive qui permet, à partir d'une prise de sang chez la femme enceinte, de mesurer par séquençage haut débit, dans l'ADN circulant (composé à la fois d'ADN maternel et d'ADN fœtal), le nombre de fragments de séquence venant de chaque chromosome. Si l'analyse montre un excès de séquence du chromosome 21, il y a une très forte suspicion de T21 chez le fœtus (qui doit alors être confirmée par PVC ou amniocentèse). Cette méthode, pratiquée chez les femmes à risque a une fiabilité de plus de 99 % et permet de diminuer drastiquement le nombre de prélèvements invasifs. En France, une étude est en cours afin de voir comment organiser le dépistage prénatal avec ce

diagnostic prénatal non invasif. Pour l'instant, il n'est pas pris en charge par l'assurance maladie (fin 2014 : 650 € non remboursés) et il permet une réponse environ en 10–15 jours.

Le caryotype fœtal (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »)

La réalisation du caryotype fœtal permet d'avoir un diagnostic de certitude, par PVC vers 12–14 SA, ou amniocentèse à partir de 16 SA, pris en charge par l'assurance maladie du fait du risque augmenté de T21.

On rappelle que l'amniocentèse est un examen préférable sur le plan cytogénétique à la PVC du fait de sa meilleure résolution et surtout à cause des discordances fœtoplacentaires (de l'ordre de 1–2 %) des PVC. La PVC permet une réponse en 2–3 jours sur l'examen direct, et 2–3 semaines pour le résultat définitif à la culture. Le résultat du caryotype sur l'amniocentèse demande deux à trois semaines. On peut réaliser une technique plus rapide sur l'amniocentèse, utilisant la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, pour *fluorescence in situ hybridization*) avec une sonde spécifique du chromosome 21 sur noyaux en interphase. La présence de trois signaux d'hybridation signe une T21. Elle permet d'obtenir un résultat en 24–48 heures. Elle est à utiliser pour un résultat rapide en cas d'anomalie échographique évocatrice de T21.

Cependant, le caryotype reste l'examen de référence. Il permet de confirmer le résultat de la FISH et surtout de connaître le type de trisomie (libre, par translocation, etc.) et donc de préciser le conseil génétique.

PVC transabdominal et amniocentèse entraînent un risque de perte fœtale de l'ordre de 0,5 à 1 % dans les deux jours qui suivent.

Le prélèvement doit être accompagné d'une prescription médicale signée, des documents permettant de déterminer l'indication et de procéder à la prise en charge éventuelle par l'assurance maladie, et du consentement signé par la patiente et le médecin prescripteur.

Les signes échographiques de T21 après le premier trimestre (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »)

On l'a vu, un certain nombre de malformations sont plus fréquentes et concernent environ la moitié des fœtus porteurs

de T21. Beaucoup peuvent être vues à l'échographie anténatale, en particulier les malformations cardiaques, comme le CAV, ou digestives, comme l'atrésie duodénale. Toutefois, l'échographie anténatale n'est pas totalement fiable et ne permet pas de détecter toutes les malformations. De plus, certaines ne sont jamais visibles en anténatal, comme la maladie de Hirschsprung par exemple. D'autre part, beaucoup de fœtus T21 sont indemnes de toute malformation.

Certaines particularités échographiques représentent un risque augmenté d'anomalie chromosomique, en particulier de T21 : l'absence de visualisation des os propres du nez, anomalies de vascularisation sous-hépatique (canal d'Arantius).

Enfin, sont décrits des « petits » signes au deuxième trimestre qui n'ont pas de valeur individuellement : profil plat, clinodactylie du cinquième doigt, petites oreilles, fémur court, humérus court, etc. et ne sont pas spécifiques de la T21. L'intérêt de les rechercher est extrêmement discuté du fait de leur très faible valeur prédictive, en outre ce *genetic scan* doit être fait vers 18 SA.

Après le diagnostic prénatal

La femme enceinte a le choix de la décision d'interrompre ou non la grossesse en cas de T21 (l'avis du conjoint n'est pas requis). Dans la loi sur les interruptions médicales de grossesse (IMG), aucune liste de situations qui justifient ou ne justifient pas le recours à l'IMG n'est donnée, la décision doit se prendre sur la « forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic ». L'IMG ne peut être décidée que s'il y a demande du couple : il est erroné de dire qu'un couple refuse l'IMG, il faut dire qu'il ne la demande pas.

En cas de souhait d'IMG par le couple, celle-ci doit être acceptée par deux médecins faisant partie d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN) (voir [chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »](#)), qui signeront le certificat autorisant l'IMG. La femme a alors, sauf urgence, une semaine de réflexion. Il n'y a pas de délai à la réalisation de l'IMG en France ; elle peut être pratiquée jusqu'au terme de la grossesse.

Conclusion

La T21 existe depuis que notre espèce existe. Elle a été reconnue cliniquement au XIX^e siècle et son origine chromosomique a été identifiée au XX^e siècle.

L'accompagnement des personnes avec une T21 a nettement évolué depuis 40 ans, permettant une meilleure autonomie, une amélioration de la participation des personnes à la vie de notre société et une plus longue vie en bonne santé. Le XXI^e siècle voit le développement

des premières véritables études cliniques en vue d'améliorer les capacités cognitives de ces personnes, basées sur nos connaissances des gènes du chromosome 21, du fonctionnement du système nerveux central et des modèles animaux.

ENTRAÎNEMENT 25 QCM-QCS

QCM 1

Dans le cadre du dépistage de la trisomie 21, le calcul du dépistage combiné proposé au premier trimestre est basé sur :

- A. La mesure de la clarté nucale
- B. L'âge maternel
- C. L'âge paternel
- D. les antécédents d'anomalie chromosomique dans la fratrie
- E. La présence d'une cardiopathie congénitale

QCM 2

Quel suivi régulier doit être proposé aux enfants porteurs d'une trisomie 21 ?

- A. ORL
- B. Ophtalmologique
- C. Cardiaque
- D. Urologique
- E. Orthopédique

QCM 3

Quelle(s) complication(s) est/sont à redouter chez l'adulte trisomique 21 ?

- A. Sécheresse cutanée
- B. Cataracte
- C. Dysurie
- D. Syndrome parkinsonien
- E. Syndrome démentiel de type Alzheimer

QCM 4

Quelles complications sont à redouter durant la première année de vie chez un(e) enfant porteur/euse de trisomie 21 ?

- A. Cataracte
- B. Leucémie aiguë
- C. Syndrome de West
- D. Apnées du sommeil
- E. Maladie cœliaque

QCM 5

Les enfants porteurs de trisomies 21 sont plus fréquemment soumis à :

- A. Apnées du sommeil
- B. Infections
- C. Tumeurs solides
- D. Instabilité C1-C2
- E. Diabète

QCM 6

La prise en charge des enfants porteurs de trisomie 21 :

- A. N'est pas forcément multidisciplinaire
- B. Nécessite l'investissement des parents
- C. Nécessite de l'orthophonie
- D. Ne nécessite pas d'aide psychologique
- E. Nécessite un apport vitaminique augmenté

QCM 7

L'adulte porteur de trisomie 21 :

- A. Ne peut pas travailler
- B. Doit rester chez ses parents
- C. Doit généralement être mis sous une mesure de protection
- D. Peut intégrer une structure de type ESAT
- E. Ne peut pas pratiquer de sport

QCM 8

Quelle(s) est(sont) la(les) malformation(s) digestive(s) la(les) plus fréquente(s) chez un nouveau-né trisomique 21 ?

- A. Imperforation anale
- B. Atrésie duodénale
- C. Atrésie de l'œsophage
- D. Présence d'une rate surnuméraire
- E. Mésentère commun

QCM 9

Quelles formules chromosomiques sont compatibles avec un tableau clinique de trisomie 21 ?

- A. 47,XXY
- B. 45,XX,der(14;21)(q10;q10)
- C. 45,X
- D. 47,XY,+21
- E. 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21

QCS 1

Le diagnostic de trisomie 21 en période anténatale s'effectue avec :

- A. Le dosage des marqueurs sériques maternels
- B. L'échographie
- C. L'âge de la mère
- D. L'âge du père
- E. Le caryotype fœtal

QCS 2

Quelle est la malformation à rechercher en priorité à la naissance chez un enfant porteur de trisomie 21 ?

- A. Cardiaque
- B. Digestive
- C. Rénale
- D. Cérébrale
- E. Vertébrale

QCS 3

Quel organisme est chargé de l'orientation des enfants trisomiques 21 ?

- A. SESSAD
- B. CAMSP
- C. MDPH
- D. CLIS
- E. CDES

QCS 4

Quelle complication biologique doit être recherchée régulièrement chez les enfants porteurs de trisomie 21 ?

- A. Hyperuricémie
- B. Anémie
- C. Hypothyroïdie
- D. Hypernatrémie
- E. Protéinurie

QCS 5

Quelle complication néoplasique est à redouter particulièrement chez les enfants porteurs de trisomie 21 ?

- A. Lymphome
- B. Sarcome
- C. Tumeur cérébrale
- D. Leucémie aiguë myéloïde
- E. Hépatocarcinome

QCS 6

Quel est le type cytogénétique le plus fréquent de trisomie 21 ?

- A. Trisomie 21 en mosaïque
- B. Trisomie 21 par translocation robertsonienne
- C. Trisomie 21 par translocation réciproque
- D. Trisomie 21 libre et homogène
- E. Trisomie 21 partielle

QCS 7

Quel est le risque de récurrence de trisomie 21 pour un couple ayant eu un enfant porteur de trisomie 21 secondaire

à une mauvaise disjonction d'une translocation 14; 21 d'origine maternelle ?

- A. 1 %
- B. 100 %
- C. 50 %
- D. 15 %
- E. 3 %

QCS 8

Quel est le risque de récurrence de trisomie 21 pour un couple ayant eu un enfant porteur d'une trisomie 21 libre et homogène ? L'âge de la femme est de 30ans :

- A. 1 %
- B. 100 %
- C. 50 %
- D. 15 %
- E. 2 %

QCS 9

Trisomie 21 et procréation :

- A. Les adultes porteurs de trisomies 21 sont stériles
- B. Les enfants nés d'hommes trisomiques 21 sont tous porteurs de T21
- C. Seulement les hommes porteurs de T21 sont stériles
- D. Les personnes trisomiques 21 (T21 libre) ont un risque théorique de 50 % de conception trisomique 21
- E. Les femmes trisomiques 21 n'ont pas de risque de donner naissance à un enfant trisomique 21

QCS 10

Les enfants porteurs de trisomie 21 :

- A. N'acquièrent jamais la marche
- B. Acquièrent le langage à la même période que les enfants non trisomiques
- C. Ont une sensibilité à la douleur augmentée
- D. Ne doivent pas être vaccinés
- E. Peuvent réagir différemment à certains médicaments

QCS 11

La trisomie 21 :

- A. Touche uniquement les populations européennes
- B. Est la première cause de déficience intellectuelle d'origine génétique
- C. Est médicalement nommé « mongolisme »
- D. Est une pathologie acquise
- E. Ne peut pas être diagnostiqué en période néonatale

This page intentionally left blank

Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie génétique : la mucoviscidose

Claude Férec

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	310	Le diagnostic de mucoviscidose au cours de la grossesse	316
Le gène <i>CFTR</i> et ses mutations	310	La prise en charge des couples confrontés à un problème de stérilité par absence de canaux déférents	316
Les classes de mutations	311	Les pathologies associées à des dysfonctionnements de la protéine <i>CFTR</i> (<i>CFTR</i> -RD)	316
Les relations génotype/phénotype	312	Les espoirs thérapeutiques	317
Apport de la connaissance du gène au diagnostic de la mucoviscidose	313	Conclusion	317
Le dépistage néonatal de la mucoviscidose	314		
Le conseil génétique	314		



Prérequis

- La connaissance des modes de transmissions des maladies génétiques (dominant, récessif lié à l'X, autosomique récessif, mitochondrial).
- La structure d'un gène d'eucaryote (notion d'exon, intron, de promoteur, de région 3' UTR).
- La notion de mutation et de polymorphisme.
- Les types de mutations rencontrées dans un gène de maladie.
- Les techniques d'étude de mutation dans un gène d'eucaryote.
- La loi de Hardy-Weinberg.
- Le diagnostic anténatal : choriocentèse, amniocentèse.
- Le diagnostic préimplantatoire (quand, comment, où).
- La notion de maladie monogénique et de maladie complexe.
- Les grandes stratégies de thérapie des maladies monogéniques.



L'essentiel à retenir

La mucoviscidose est une maladie monogénique de transmission autosomique récessive. Le gène responsable est le gène *CFTR* situé sur le bras long du chromosome 7, il code pour un canal chlorure régulé par l'AMP cyclique.

C'est la plus fréquente des maladies génétiques graves de l'enfant : elle touche une naissance sur 4 500 en France et une personne sur 32 est porteuse d'une mutation dans ce gène.

La mutation la plus fréquente dans ce gène est une courte délétion correspondant à la perte d'un acide aminé la phénylalanine en position 508 ; elle est présente chez 70 % des patients.

Le risque de donner naissance à un enfant atteint pour les couples porteurs à l'état hétérozygote d'une mutation dans le gène *CFTR* est de 1/4 et c'est le risque de récurrence à chaque grossesse.

La découverte du gène *CFTR* et l'identification des différentes classes de mutation dans ce gène ont conduit au développement de thérapies pharmacologiques « mutations spécifiques ».

Introduction

La mucoviscidose encore appelée « fibrose kystique du pancréas » est classiquement considérée comme la plus

fréquente des maladies génétiques graves de l'enfant dans la population caucasioïde.

La mucoviscidose est une exocrinopathie dont l'expression clinique se traduit essentiellement par une atteinte pulmonaire et digestive. Sur le plan pulmonaire, il s'agit d'une bronchopathie chronique obstructive évoluant vers l'insuffisance respiratoire terminale en trois ou quatre décennies ; l'atteinte pulmonaire est responsable de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité de la maladie. Le tableau clinique est complété par une atteinte digestive caractérisée par une insuffisance pancréatique exocrine présente chez 85 % des malades. Les hommes atteints de mucoviscidose sont stériles ; cette stérilité est liée à une azoospermie excrétoire par une absence de canaux déférents [1].

La maladie se transmet sur le mode autosomique récessif ; elle affecte un nouveau-né sur 4 700 en France avec des différences locorégionales significatives en matière d'incidence (une naissance pour 3 600 en Bretagne, une pour 7 800 en région parisienne) [2].

La maladie a été décrite pour la première fois par Fanconi en 1938 sous le nom de fibrose kystique du pancréas [3]. Elle a par la suite été mieux diagnostiquée dans la seconde moitié du 20^e siècle à la suite des travaux de di Sant' Agenese, qui découvrit que la sueur de ces enfants était anormalement salée. Il proposa un test biologique, le test de la sueur mesurant la concentration en Cl⁻ et en sodium de la sueur. Une valeur du test supérieure à 60 mmol/L est très spécifique de la maladie et reste aujourd'hui le test de référence diagnostique [4].

Le gène responsable de la mucoviscidose – le gène *CFTR* (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) a été identifié en 1989 grâce à une collaboration nord-américaine coordonnée par Lap-Chee Tsui à Toronto [5–7]. Cette date est à marquer d'une pierre blanche dans l'histoire de la mucoviscidose car la connaissance du gène a permis de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie, d'apporter de nouvelles approches de diagnostics moléculaires anté- et post-natales et, ce qui est le plus important, de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le gène *CFTR* et ses mutations

Le gène *CFTR* est le premier gène situé sur un autosome qui a été cloné grâce à une stratégie réussie de clonage positionnel. Alors que les généticiens n'avaient aucune connaissance de la protéine responsable de la maladie, par une stratégie de liaison génétique ils sont parvenus d'abord à cartographier le gène sur le bras long du chromosome 7 en 7q [8] puis à s'en rapprocher pour finalement réussir à le cloner en 1989 [5–7].

Composé de 27 exons et s'étendant sur 180 kb, ce gène code pour une protéine transmembranaire de 1 480 acides aminés qui est un canal chlorure régulé par l'AMPc. Ce canal de faible conductance est un régulateur d'autres canaux, en particulier des canaux sodiques comme le canal ENaC (pour *epithelial Na channel*) ou le canal chlorure à rectification sortante (*outwardly rectifying chloride channel* [ORCC]) [9, 10] (figure 28.1 et e-figure 28.2).

L'étude moléculaire du gène *CFTR* a été réalisée dans le cadre d'une collaboration internationale exemplaire menée sous l'égide du découvreur du gène – Lap-Chee Tsui – au travers d'un consortium international d'étude des mutations du gène (*cystic fibrosis gene mutation analysis* : www.genet.sickkids.on.ca) [11] dans lequel plus de 100 laboratoires dans le monde ont, depuis 20 ans, colligé en temps réel les résultats de leurs travaux.

Nous avons aujourd'hui une connaissance approfondie de la pathologie moléculaire du gène *CFTR*, qui se caractérise par la présence d'une mutation très fréquente : la délétion F508del correspondant à la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine (nomenclature officielle selon les recommandations de la Human Genome Variation Society : p.Phe508del). Cette délétion est présente sur plus de deux chromosomes mutés sur trois parmi les patients dans la population européenne. Six autres mutations ont une fréquence qui dépasse le seuil de 1 % [G542X (p.Gly542*); N1303K (p.Asn1303Lys); c.2657+5G/A; G551D (p.Gly551Asp); 1717-1G>A (c.1585-1G>A); R553X (p.Arg553*)] et à côté de cela, il existe aujourd'hui près de 2000 mutations répertoriées, dispersées

au sein des 27 exons du gène. Ce sont souvent des événements rares ou privés, témoignant de l'extraordinaire variabilité allélique du spectre mutationnel dans le gène *CFTR* [12].

Le type de mutation, leur fréquence varient beaucoup selon l'origine géographique et ethnique des patients [13]; il est important, pour orienter le laboratoire dans sa recherche de mutations, de bien documenter les origines des patients et de leurs parents. Pour illustrer ceci, on peut rappeler que la mutation W1282X (en nomenclature traditionnelle ou bien p.Trp1282* en nomenclature HGVS) est la mutation la plus fréquente dans la population juive ashkénaze [14] tandis que la mutation G551D (en nomenclature traditionnelle ou p.Gly551Asp en nomenclature HGVS) rend compte de 5 % des mutations dans les populations d'origine celte comme les Bretons et les Irlandais [15]. La mutation G542X (en nomenclature traditionnelle ou p.Gly542* en nomenclature HGVS) est quant à elle fréquente dans les populations du pourtour méditerranéen.

Les classes de mutations (voir chapitre 9, « Anomalies génétiques à l'échelle du gène »)

Les 1 960 mutations rapportées à ce jour dans ce gène sont essentiellement des mutations ponctuelles : mutations faux-sens (45 %), mutations non-sens (15 %), mutations troncatives (20 %) et grands réarrangements (3 %). Elles ont

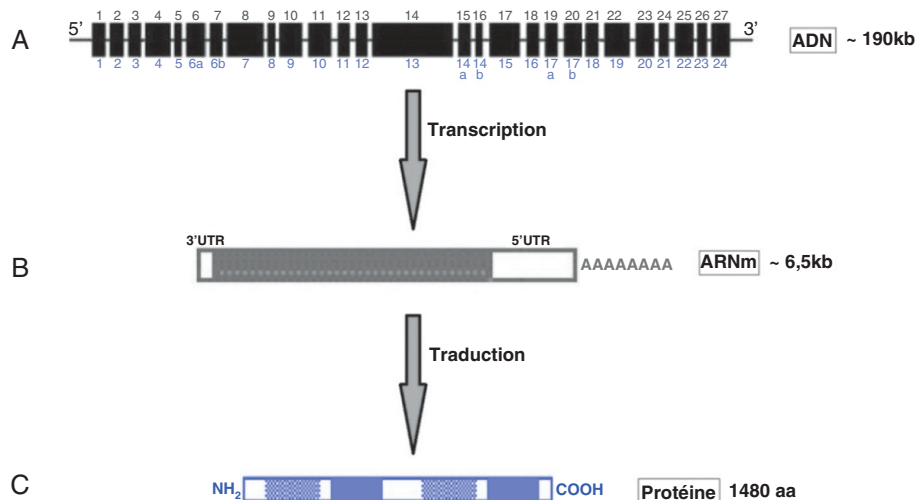
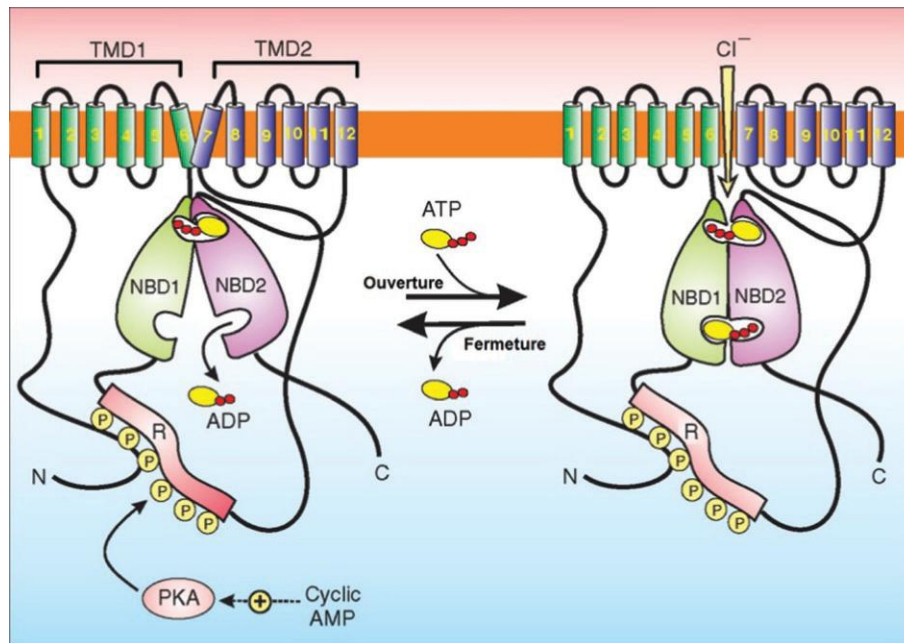


Figure 28.1

Du gène *CFTR* à la protéine *CFTR*.

A. Le gène *CFTR*, identifié en 1989, est un grand gène constitué de 27 exons qui s'étend sur une région génomique d'environ 190 kb. Les exons sont numérotés de 1 à 27 selon la nomenclature officielle internationale de la HGVS (Human Genome Variation Society). On peut aussi les trouver numérotés de 1 à 24, avec les exons 6, 14 et 17 divisés en deux, selon l'ancienne nomenclature. B. Le gène *CFTR* code un ARN messager (ARNm) de 6,5 kb. C. 4,4 kb seront traduites en une protéine membranaire de 1480 acides aminés (aa).



e-figure 28.2

Activation du canal CFTR.

La fixation d'un ATP au niveau des domaines NBD entraîne la phosphorylation du domaine R par les PKA au niveau de résidus sérines. Cette phosphorylation produit un changement de conformation de la protéine qui permet l'ouverture du canal et ainsi le passage d'ions Cl⁻.

Adaptée de www.biochemj.org/csb/frame.htm

<https://www.univers-medecine.com>

pu être réparties en cinq classes selon l'impact qu'elles produisent sur la fonction de la protéine [16] :

- les mutations de classe 1 sont des mutations non-sens ou des délétions/insertions, plus rarement de grandes délétions conduisant à une absence d'expression de la protéine CFTR à la surface de la membrane apicale des cellules épithéliales;
- les mutations de classe 2 conduisent à des anomalies de repliement et de trafic intracellulaire de la protéine (la mutation p.F508 del appartient à la classe 2);
- les mutations de classe 3 impactent la régulation de la protéine CFTR et sont souvent des mutations faux-sens situées au niveau des domaines NBF (pour *nucleotide binding fold*) où se lie l'ATP;
- les mutations de classe 4 sont des mutations faux-sens situées dans le canal transmembranaire et ces mutants affectent la conductance du canal CFTR;
- les mutations de classe 5 correspondent à des anomalies moléculaires qui affectent la transcription. Elles diminuent quantitativement la quantité de transcrits normalement exprimés et donc *in fine* la quantité de protéine CFTR exprimée à la membrane.

Une classe 6 est parfois proposée pour regrouper les mutations qui impactent la stabilité de la protéine (figure 28.3).

Les relations génotype/phénotype

La découverte des mutations du gène *CFTR* a, depuis 25 ans, ouvert un vaste champ de recherche qui nous permet aujourd'hui de mieux comprendre les relations

entre le génotype et le phénotype et, par là même, de mieux comprendre l'influence respective de la génétique et de l'environnement dans la variabilité de l'expression clinique observée chez les patients atteints de mucoviscidose [17].

Selon leur impact sur la fonction de la protéine, on considère de façon un peu schématique que les mutations peuvent être classées en « mutations sévères » où l'on range les mutations de classe 1, 2 et 3, ou en « mutations peu sévères », où l'on retrouve les mutations de classe 4 et 5 [18].

Les mutations dites sévères sont associées, sur le plan phénotypique, à une insuffisance pancréatique, à une atteinte pulmonaire qui débute dans l'enfance et qui est marquée par une colonisation précoce par le *Pseudomonas aeruginosa*. Ce sont les formes de présentation classique de la maladie et les patients homozygotes F508del en sont les exemples les plus fréquemment rencontrés [19].

Par contre, l'association d'une mutation que l'on qualifie de peu sévère et d'une mutation sévère, ou l'association de deux mutations peu sévères conduit en règle générale à une fonction pancréatique exocrine conservée que l'on nomme suffisance pancréatique et à une colonisation pulmonaire plus tardive par le *Pseudomonas aeruginosa*. Cette forme d'expression clinique plus modérée se traduit pour ces patients par une espérance de vie d'environ 50 ans alors qu'elle se situe aujourd'hui autour de 30 ans pour les formes sévères qui sont, dans leur grande majorité, représentées par des patients porteurs à l'état homozygote de la mutation p.F508 del [20].

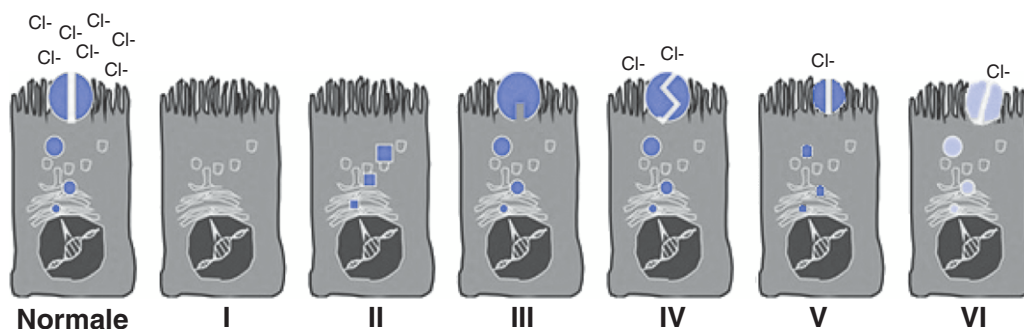


Figure 28.3

Classes de mutations *CFTR*.

Les mutations du gène *CFTR* ont été distinguées en six classes en fonction des anomalies de synthèse ou fonctionnelles de la protéine CFTR : les mutations de **classe I** résultent d'un **défaut de synthèse** de la protéine CFTR ; les mutations de **classe II** regroupent les anomalies conduisant à un **défaut de maturation** de la protéine CFTR ; les mutations de **classe III** correspondent à un **défaut de régulation** de la protéine CFTR ; les mutations de **classe IV** représentent un **défaut de conductance** de la protéine CFTR ; les mutations de **classe V** décrivent un **défaut de stabilité** de l'ARNm *CFTR* ; les mutations de **classe VI** rassemblent les altérations donnant lieu à un **défaut de stabilité** de la protéine CFTR.

D'après [1].

Ces données sont établies à partir de larges cohortes de patients (généralement issues des registres de mucoviscidose), si elles sont parfaitement vérifiées statistiquement ; il n'en demeure pas moins que l'on peut observer une grande variabilité dans l'expression de la maladie à l'échelle individuelle. Ainsi, un patient donné porteur de deux mutations sévères peut parfaitement présenter un phénotype relativement « peu sévère » pendant de nombreuses années et, à l'inverse, la présence d'une mutation qualifiée *a priori* de « peu sévère » chez un patient peut parfois s'accompagner d'une évolution rapide vers l'insuffisance respiratoire terminale. Ces données de corrélation génotype/phénotype doivent être maniées avec prudence car, si elles sont globalement vraies lorsque l'on analyse un groupe de patients, elles doivent être utilisées avec la plus grande précaution à l'échelle individuelle.

Au-delà des mutations portées par le patient, la variabilité de l'expression de la maladie est aussi largement influencée par des facteurs d'environnement (facteurs socio-économiques, tabagisme, compliance au traitement, etc.) et par d'autres facteurs génétiques que l'on appelle des gènes modificateurs (gènes impliqués dans la réponse immunitaire, dans l'inflammation [21]).

Apport de la connaissance du gène au diagnostic de la mucoviscidose

Le diagnostic de mucoviscidose reste par essence un diagnostic clinique qui repose sur des critères de consensus définis par Rosenstein et Cutting [22]. Ces critères sont les suivants : le diagnostic de mucoviscidose repose sur l'association chez un patient d'un ou plusieurs traits phénotypiques de la maladie et sur l'existence d'un apparenté atteint ou d'un test de dépistage néonatal positif et d'un test de la sueur positif en deux occasions, ou encore sur la présence d'une mutation causale en double exemplaire.

L'évolution des techniques de biologie moléculaire a été considérable au cours de ces vingt-cinq dernières années. L'avènement de la technique d'amplification génique, la PCR, a révolutionné la génétique et la biologie en général.

Il n'en demeure pas moins que le test de la sueur reste le test biologique de première intention devant tout tableau clinique évocateur de mucoviscidose. On considère qu'un

test de la sueur est positif s'il est supérieur à 60 mEq/L, intermédiaire s'il est compris entre 30 et 60 mEq/L, et négatif s'il est inférieur à 30 mEq/L. Aujourd'hui, la stratégie d'étude du gène est bien codifiée. Devant un tableau clinique de suspicion de mucoviscidose, la première étape, la plus simple, est de rechercher la présence de mutations fréquentes. Pour ce faire, il existe aujourd'hui de nombreux kits qui permettent de dépister en quelques heures une trentaine de mutations du gène, mutations qui sont les plus fréquemment rencontrées dans le monde.

L'étude de ces 30 mutations permet, dans 60 % des cas, d'établir le génotype du patient. Les deux mutations sont alors identifiées ; elles sont soit identiques et le patient est homozygote pour la mutation considérée, soit différentes et le patient est dit hétérozygote composite.

Si le génotype est incomplet parce qu'il manque une ou deux mutations, l'étude du gène est poursuivie soit par une technique de séquençage complet des 27 exons par un séquençage massif parallèle (dit de nouvelle génération) ou bien par une technique de "balayage de la région codante", qui permet au niveau de chacun des exons du gène de mettre en évidence la présence d'une anomalie moléculaire confirmée par une réaction de séquençage. Au terme de ce balayage complet des 27 exons du gène, les 1960 mutations sont recherchées et s'il reste encore un allèle non identifié, il faut mettre en place une technique de recherche de grand réarrangement (délétion/duplication). Ces anomalies rendent compte de 2 % des anomalies du gène *CFTR* [23–25]. Cette approche classique qui a prévalu pendant de nombreuses années est aujourd'hui remplacée par des techniques de séquençage massif parallèle à haut débit.

Au terme de cette recherche, il reste environ 1 à 2 % des sujets atteints de mucoviscidose (selon l'origine géographique ou ethnique du patient) pour lesquels au moins une mutation n'est pas caractérisée. Il est probable qu'il s'agit chez ces patients de mutations introniques ou de mutations situées dans les régions régulatrices en 5' ou en 3' du gène.

Aujourd'hui, le taux de couverture des mutations pour un patient dépend, au-delà de son origine géographique ou ethnique, des techniques et des stratégies d'analyse utilisées, ainsi que des capacités du laboratoire à mettre en place et à maîtriser les techniques les plus sophistiquées d'étude du gène. Dans beaucoup de pays d'Europe du Nord, ainsi qu'aux États-Unis ou au Canada, ce taux de couverture atteint 98 % voire 99 %. Ceci illustre bien le fait que l'on n'est pas aujourd'hui en mesure d'avoir un taux de couverture de 100 % des mutations du gène *CFTR*.

Le dépistage néonatal de la mucoviscidose (voir chapitre 16, « Dépistage néonatal : éléments à l'usage des cliniciens généticiens »)

Mis en place dans les années 1990 dans quelques régions comme la Bretagne ou la Normandie et dans quelques pays dans le monde, le dépistage néonatal a reposé initialement sur la présence dans le sang des nouveau-nés, au troisième jour de vie, d'une hypertrypsiniémie positive. Ce test était sensible mais peu spécifique. La découverte du gène et de ses mutations fréquentes a conduit à proposer un test de dépistage original associant le dosage de la trypsine immunoréactive et la recherche des mutations les plus fréquentes du gène. Ainsi, ce test qui permet d'associer la sensibilité de l'hypertrypsiniémie à la spécificité du dépistage des mutations du gène *CFTR* est maintenant en place en France depuis 10 ans et s'étend progressivement à tous les pays européens et à tous les États des États-Unis. Ce dépistage permet de diagnostiquer précocement la maladie et d'assurer dans les centres cliniques spécialisés (les centres de ressources et de compétence de la mucoviscidose [CRCM]) la prise en charge précoce des enfants atteints [2, 26, 27].

Le conseil génétique (voir chapitre 12, « Conseil génétique »)

Cette connaissance précise du gène à l'échelle moléculaire accumulée depuis vingt-cinq ans va nous permettre de proposer un conseil génétique éclairé aux patients, à leurs familles et plus largement à leurs apparentés. Nous allons détailler les différentes situations dans lesquelles un conseil génétique doit être proposé aux familles.

Il faut rappeler que pour cette maladie de transmission récessive, dont l'incidence observée est de 1/3 000 à 1/7 000 selon les régions, le taux de porteurs de l'allèle muté dans la population est de 1/30 à 1/35.

Lorsqu'un diagnostic de mucoviscidose est posé, au-delà de la prise en charge de l'enfant en milieu spécialisé, une prise en charge dans le cadre d'une consultation de conseil génétique s'impose pour le couple et ses apparentés.

Prise en charge des couples à risque de 1/4

Dans cette situation, les deux parents sont hétérozygotes, c'est-à-dire porteurs asymptomatiques d'une mutation dans le gène *CFTR* (figure 28.4). Dans la très grande majorité des cas, il s'agit de couples qui ont donné naissance à un enfant atteint lors d'une précédente grossesse, mais il peut s'agir également de couples qui ont été identifiés à la suite d'un dépistage en cascade réalisé dans les familles à risque où la naissance d'un enfant atteint a déclenché une recherche des porteurs chez les apparentés.

Le risque de récurrence à chaque grossesse étant de 25 %, un conseil génétique sera proposé à ces couples. Une information complète leur sera donnée sur la maladie elle-même, sur le risque de récurrence à chaque grossesse et une possibilité de diagnostic prénatal (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »), s'ils le souhaitent, leur sera proposée [29].

Ce diagnostic prénatal sera possible par choriocentèse dès 11 semaines d'aménorrhée voire un peu plus tard, à partir de 16 semaines d'aménorrhée par amniocentèse. Dans tous les cas, le diagnostic sera réalisé par biologie moléculaire et l'on recherchera dans l'ADN foetal la présence ou l'absence des mutations du gène *CFTR* identifiées chez les parents. Le statut du fœtus – non porteur, hétérozygote ou atteint – sera déterminé. On s'assurera, pour chaque diagnostic prénatal, de la validité biologique de la paternité, ce test reposant sur l'étude des microsatellites situés à proximité du gène ou sur l'ensemble du génome. Le résultat du diagnostic prénatal est obtenu en 48 heures. Dans 98 % des cas, les mutations paternelles et maternelles sont connues et le diagnostic est direct par recherche de ces mutations au niveau de l'ADN foetal. Si l'une des mutations n'est pas connue, on s'appuiera sur un diagnostic indirect en utili-

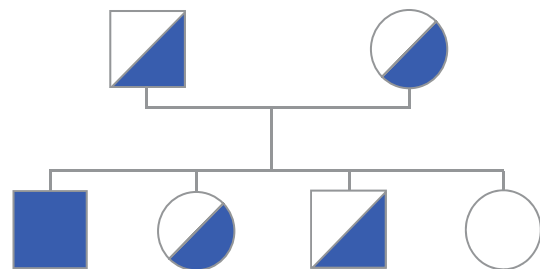


Figure 28.4

Couples à risque de 1/4.

sant des marqueurs polymorphes intra- ou extragéniques qui caractérisent le chromosome porteur de l'allèle délétère inconnu.

Nous avons récemment fait le bilan de notre activité de 18 années de diagnostic prénatal de mucoviscidose et nous avons pu montrer que la spécificité de l'analyse de biologie moléculaire était de 100 % [28, 29]. Il faut noter à ce propos que la très grande majorité des couples – 96 % – à risque de 1/4 pour lesquels le diagnostic de mucoviscidose fœtale est porté opte pour une demande d'IMG.

Une seconde possibilité peut être proposée à ces couples à risque de 1/4. Il s'agit du diagnostic préimplantatoire réalisé dans le cadre d'une procréation médicalement assistée, après une technique d'ICSI (pour *intracytoplasmic sperm injection*) qui permet d'injecter l'ADN d'un spermatozoïde dans un ovocyte [33]. Il s'agit ensuite d'analyser au stade 6–8 cellules le blastocyste en prélevant une ou deux cellules et en analysant le statut de ce futur embryon, et ensuite de ne réimplanter que les embryons non atteints. Ces techniques moléculaires très sophistiquées exigent un très haut niveau de technicité. Le diagnostic préimplantatoire est réservé à quelques laboratoires (il y en a quatre en France : CHRU Montpellier : Pr Mireille Claustres – AHPH, Paris : Pr Arnold Munnich – CHRU Strasbourg : Pr Stéphane Viville, CHRU Nantes : Pr Cédric Le Caignec). Le délai d'attente est long, ce qui limite l'accès à cette technique. Sont considérées comme prioritaires les femmes qui ont déjà dû subir plusieurs IMG à la suite de diagnostics prénatals malheureusement positifs.

Couples à risque de 1/2

Les progrès réalisés ces dernières décennies dans la prise en charge clinique de la mucoviscidose ont été remarquables et nous avons aujourd'hui une population d'adultes et une population d'enfants équivalente. Ces patients sont de plus en plus nombreux à avoir des projets de vie de couples, des désirs d'enfants et à solliciter un conseil génétique dans ce cadre.

Les femmes atteintes de mucoviscidose ont une fertilité normale dans 80 % des cas, tandis que les hommes sont stériles dans plus de 98 % des cas. Il s'agit d'une azoospermie excrétoire par agénésie bilatérale des canaux déférents. Ces derniers doivent donc être adressés à un spécialiste pour confirmer ou non l'azoospermie et proposer, le cas échéant, une assistance médicale à la procréation.

Les patients atteints de mucoviscidose transmettant obligatoirement une des deux mutations dont ils sont porteurs, le risque pour leur couple d'avoir un enfant atteint avant toute étude de biologie moléculaire est très élevé (1/60 i.e. $1 \times 1/30 \times 1/2$). Il est donc primordial de réaliser une étude exhaustive du gène *CFTR* chez le conjoint afin d'écarter le maximum de mutations et de pouvoir réduire le risque résiduel de mucoviscidose. En écartant 98 % ou 99 % des mutations selon l'origine du conjoint, le risque résiduel de mucoviscidose pour ce couple rejoint le risque d'un couple pris au hasard dans la population générale. En revanche, si le conjoint se révèle être hétérozygote, le couple devient à risque de 1/2 (e-figure 28.5) et un diagnostic prénatal leur sera proposé dans le cadre d'une consultation de génétique.

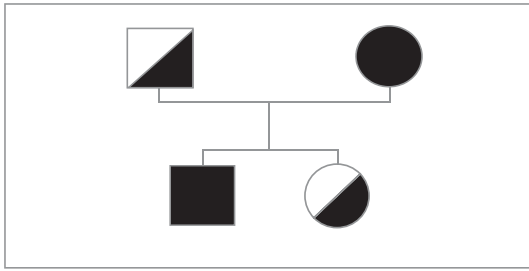


Couples à risque a priori de 1/120

Il s'agit de couples dans lesquels l'un des partenaires est porteur à l'état hétérozygote d'une mutation dans le gène *CFTR*. Le risque *a priori* pour ces couples avant toute analyse de génétique est de 1/120 ($1/2 \times 1/30 \times 1/2$).

Le but de l'étude moléculaire va être de modifier cette probabilité *a priori* de 1/120 en probabilité *a posteriori* après avoir analysé le gène *CFTR* chez le conjoint qui est, *a priori*, non porteur. Une première étude simple recherchant la présence éventuelle de la mutation F508del et des 30 mutations les plus fréquentes du gène permet d'écarter environ 90 % des mutations du gène (ce taux de couverture peut varier légèrement selon les régions de France et l'origine ethnique des sujets). Si l'on s'arrête à ce niveau d'analyse du gène, le risque résiduel pour ce couple est de 1/1200. Ceci est satisfaisant, mais nous avons aujourd'hui la possibilité d'étudier la totalité de la région codante du gène par séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing* [NGS]) (voir chapitre 11, « Le séquençage de nouvelle génération : principe, applications en diagnostic et perspectives ») et d'écarter au moins 98 % voire 99 % des mutations du gène et ainsi de proposer à ces couples, lorsque l'analyse du conjoint non porteur est négative, un risque résiduel de mucoviscidose pour leurs enfants qui se situe entre 1/2500 et 1/5000. Ce risque devient proche de celui encouru par un couple pris au hasard dans la population générale.

Lorsqu'une mutation est identifiée chez le conjoint du porteur, nous sommes alors en présence d'un couple à risque de 1/4 et la prise en charge correspond à celle décrite précédemment.



e-figure 28.5

Couples à risque de 1/2.

Le diagnostic de mucoviscidose au cours de la grossesse (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »)

L'examen systématique par échographie des femmes au cours de la grossesse a conduit les gynécologues et les échographistes à identifier dans le suivi de certaines grossesses la présence d'un intestin hyperéchogène. Cette image anormale, qui est le plus souvent détectée lors de l'échographie du second trimestre, est associée (selon les expériences rapportées dans la littérature) dans 3 % à 9 % des cas à un diagnostic de mucoviscidose *in utero* [28]. La détection d'une telle image, bien que non spécifique, justifie la réalisation d'une étude du gène *CFTR* chez le couple.

Au cours de notre propre expérience, reposant sur 15 ans de suivi des naissances en Bretagne, nous avons pu colliger très précisément le nombre de nouveau-nés atteints durant cette période et pu mesurer très exactement qu'aujourd'hui 10 % des enfants atteints de mucoviscidose étaient diagnostiqués *in utero* à la suite de la découverte d'un intestin hyperéchogène [29].

Ces couples sont confrontés à la décision importante et brutale, au cours d'une grossesse déjà avancée, de garder l'enfant ou de demander une IMG. La consultation de conseil génétique est importante et indispensable à ce stade. Il faudra informer le couple des connaissances que nous avons aujourd'hui de cette maladie, de son évolution clinique et les accompagner au mieux dans leur prise de décision. Il faudra également les informer du risque de récurrence qui sera de 25 % pour les grossesses suivantes.

La prise en charge des couples confrontés à un problème de stérilité par absence de canaux déférents

La stérilité masculine par absence de canaux déférents est la plus fréquente des causes de stérilité masculine. Peu de temps après la découverte du gène *CFTR*, il était rapporté que ce gène était pour une large part impliqué dans la survenue de cette absence de déférents chez le garçon [30].

Dans plus de 50 % des agénésies, on trouve au moins une mutation du gène *CFTR* et dans 30 % des cas on trouve l'association d'une mutation et d'une seconde anomalie discrète du gène que l'on qualifie de variant. L'exemple classique d'un tel type de variant est le variant 5T de l'intron 8 du gène qui s'accompagne d'un taux diminué d'ARN normalement transcrit et donc d'un taux diminué de protéine *CFTR* [31, 32].

Ces hommes stériles sont à risque *a priori* de 50 % d'être porteurs et il est important de les voir en conseil génétique, d'une part pour leur expliquer la relation qui existe entre leur stérilité et le gène de la mucoviscidose, voire d'écarter chez eux toute forme de mucoviscidose paucisymptomatique et, d'autre part, d'étudier le gène *CFTR* chez leur conjointe. Il importe d'identifier et de pouvoir informer les couples à risque de 1/4 de mucoviscidose. Ces couples aujourd'hui vont pouvoir bénéficier dans le cadre d'un projet parental d'une possibilité de fécondation *in vitro*, avec un taux de succès non négligeable puisque 40 % de ces fécondations *in vitro* vont aboutir à la naissance d'un enfant [33].

L'absence de canaux déférents, certaines formes de pancréatites chroniques ou de dilatations des bronches, qui sont caractérisés par un dysfonctionnement de la protéine *CFTR* sans que les critères de définition de la mucoviscidose ne soient complets, sont appelés aujourd'hui *CFTR-RD* pour *cystic fibrosis related disorders* [34].

Les pathologies associées à des dysfonctionnements de la protéine CFTR (CFTR-RD)

L'étude des relations génotype/phénotype a permis de montrer qu'il existait non seulement une variabilité allélique associée à l'expression clinique de la maladie mais qu'il existait également (comme décrit ci-dessus dans le cas de l'agénésie des déférents) des pathologies associées qui impliquent un dysfonctionnement de la protéine *CFTR*.

On range sous ce terme de *CFTR-RD* (*CFTR-related disorder*) les pathologies du *CFTR* qui ne remplissent pas les critères diagnostiques de mucoviscidose mais qui sont dues à des dysfonctionnements de la protéine *CFTR*. On va retrouver ici certaines formes d'agénésies des déférents, certaines formes de pancréatites chroniques, de dilatation des bronches voire certaines formes d'hypertrypsineémie néonatale [34].

Les espoirs thérapeutiques (voir chapitre 25, « Perspectives thérapeutiques en génétique médicale »)

Dans les années 1990, qui ont suivi la découverte du gène, la communauté médicale et scientifique s'est enthousiasmée pour le développement et la mise en place d'une thérapie génique de la mucoviscidose. Des vecteurs adéno- et lentiviraux mais également des vecteurs de synthèse ont été construits, des essais cliniques de phase 1 ont été menés, mais il fallut se rendre à l'évidence, dans les années 2000, que l'on était encore loin d'une possibilité de traitement par thérapie génique. D'une part, l'expression par les adénovirus était transitoire et immunogène, le *sputum* constitue une barrière difficilement franchissable et les cellules-souches de l'épithélium pulmonaire ne sont pas identifiées. Par ailleurs, la cible essentielle, c'est-à-dire l'épithélium pulmonaire, est remaniée, inflammatoire et encombrée de mucus ce qui rend très aléatoire l'efficacité des transfections par des vecteurs viraux ou de synthèse. On constate aujourd'hui un retour à des travaux plus fondamentaux à la fois de vectologie, qui doivent permettre de trouver un vecteur idéal et de biologie cellulaire avant d'envisager à nouveau la mise en place d'essais cliniques.

L'espoir aujourd'hui vient du développement de petites molécules qui sont de deux types, les premières appelées « correcteurs » et les secondes, « potentiateurs » ; les premières ont pour objectif de corriger l'adressage défectueux à la membrane de la protéine CFTR et le mauvais repliement de la protéine et les secondes visent à potentialiser l'ouverture du canal chlorure [35, 36].

Une molécule, le Vertex 770 (appelée aujourd'hui ivacaftor), est ressortie d'un crible réalisé par la firme pharmaceutique Vertex. Des essais de phase 2/3 sont en cours actuellement avec des premiers résultats encourageant obtenus sur des patients porteurs de la mutation G551D [37]. Des essais combinant des correcteurs et des potentiateurs sont actuellement menés avec comme cible la mutation p.F508 del. Les résultats de phase 3 montrent sur plus de 1 100 patients F508del homozygotes des résultats modestes mais significatifs. Ces travaux illustrent parfaitement la démarche actuelle engagée dans la recherche de thérapies ciblées reposant sur la connaissance du génotype des patients et soulignent l'importance du dépistage néonatal et de la connaissance exhaustive des mutations

du gène, préalable indispensable à la mise en place de ces nouvelles thérapies ciblées.

La découverte du gène *CFTR* et l'identification de la protéine responsable de la pathologie conduisant à la compréhension de la physiopathologie de la maladie, au développement du diagnostic moléculaire et à la mise en place de thérapies « mutation spécifique » resteront un exemple remarquable d'un formidable succès de la génétique qui ouvre tout grand le champ de la médecine personnalisée.

Conclusion

Le gène *CFTR* a été cloné en septembre 1989. Très rapidement, la mutation la plus fréquente du gène a été identifiée – la délétion F508del – et aujourd'hui près de 2 000 mutations ont été rapportées dans ce gène. Le développement des techniques de biologie moléculaire nous permet aujourd'hui en quelques jours d'analyser la totalité de la séquence codante du gène et d'identifier l'une de ces mutations, de confirmer ou d'infirmer dans les meilleurs délais un diagnostic de mucoviscidose chez une personne suspectée d'être porteuse de la maladie. Nous pouvons également écarter, chez les conjoints de sujets hétérozygotes, la probabilité d'être porteurs et modifier de façon considérable cette probabilité *a priori* (si on a pu écarter 95 % des mutations, le risque d'être porteur passe de 1/30 à 1/600).

L'organisation de la prise en charge du diagnostic moléculaire de la mucoviscidose a été bien structurée en France grâce à l'organisation en réseau mise en place par les laboratoires français réunis au sein de l'Association nationale des praticiens de génétique moléculaire (ANPGM) et ce grâce aux financements de la Direction générale de l'offre des soins (DGOS). Cette organisation du diagnostic moléculaire, la mise en place du dépistage systématique en période néonatale, conjointement avec la mise en place de centres de ressource et de compétence (CRCM) organisant la prise en charge clinique des enfants au sein de service dédiés et spécialisés dans la prise en charge clinique de la maladie, tout cela a contribué à améliorer notablement l'espérance de vie des enfants atteints de mucoviscidose en France [38] avec aujourd'hui une médiane de survie prédite voisine de 40 ans en France. Les laboratoires se répartissent en trois niveaux de compétence : les laboratoires de niveau 1 peuvent étudier à l'aide d'un kit les principales mutations du gène, les laboratoires de niveau 2 peuvent rechercher les mutations rares et les laboratoires de niveau 3 sont les

laboratoires de référence en charge des dossiers difficiles, de la formation et de la veille technologique. Ces derniers sont au nombre de quatre en France (CHRU Brest – APHP, hôpital Henri-Mondor, Créteil – CHRU Montpellier – APHP, hôpital Cochin, Paris).

Ce maillage du territoire permet d'offrir aux patients, quelle que soit leur situation en France, un diagnostic moléculaire de qualité permettant de leur donner, ainsi qu'à leur famille, un conseil génétique éclairé. Conseil génétique qui peut être simple dans le cadre de couples à risque de 1/4 avec des mutations connues, mais qui peut s'avérer complexe lorsque l'on se trouve confronté à la présence de mutations rares dont l'impact sur la fonction du canal CFTR n'est pas prouvé.

Enfin, la connaissance du gène, de la protéine et la meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie permettent d'entrevoir la correction des dysfonctionnements de la protéine CFTR et d'ouvrir ainsi l'ère des thérapies spécifiques de la protéine CFTR.

Références

- [1] Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso FJ, et al. Cystic fibrosis. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill; 2001.
- [2] Audrézet MP, Munck A, Scotet V, et al. Comprehensive CFTR gene analysis of the French cystic fibrosis screened newborn cohort : implications for diagnosis, genetic counseling, and mutation-specific therapy. *Genet Med* 2015; 17(2) : 108–16.
- [3] Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das coeliakie syndrom bei angeborener zystischer pancreas fibromatose und bronkiektasien. *Wien Med Wochenschr* 1936; 86 : 753.
- [4] Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perrera GA, et al. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953; 12(5) : 549–63.
- [5] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245 : 1059–65.
- [6] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245 : 1066–73.
- [7] Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science* 1989; 245 : 1073–80.
- [8] Tsui LC, Buchwald M, Barker D, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically polymorphic DNA marker. *Science* 1985; 230 : 1054–7.
- [9] Smallov II, Awayda MS, Jovov B, et al. Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 1996; 271 : 4725–32.
- [10] Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, et al. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 1995; 81 : 1063–73.
- [11] Tsui LC. Cystic Fibrosis Mutation Database : <http://genet.sickkids.on.ca>.
- [12] Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, et al. Cystic fibrosis : a worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19 : 575–606.
- [13] Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1994; 4 : 167–77.
- [14] Shoshani T, Augarten A, Gazit E, et al. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet* 1992; 50 : 222–8.
- [15] Férec C, Audrézet MP, Mercier B, et al. Detection of over 98 % cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nat Genet* 1992; 1 : 188–91.
- [16] Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73 : 1251–4.
- [17] Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 329 : 1308–13.
- [18] Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis : genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29 : 777–807.
- [19] Kerem E, Corey M, Kerem BS, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis - analysis of the most common mutation (DF508). *N Engl J Med* 1990; 323 : 1517–22.
- [20] Férec C, Cutting GR. Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(12) : a009480.
- [21] Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders : the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1214 : 57–69.
- [22] Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis : a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132 : 589–95.
- [23] Audrézet MP, Chen JM, Raguénès O, et al. Genomic rearrangements in the CFTR gene : extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 2004; 23 : 343–5724.
- [24] Niel F, Legendre M, Bienvenu T, et al. A new large CFTR rearrangement illustrates the importance of searching for complex alleles. *Hum Mutat* 2006; 27 : 716–7.
- [25] Férec C, Casals T, Chuzhanova N, et al. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene : characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet* 2006; 14 : 567–76.
- [26] Scotet V, de Braekeleer M, Roussey M, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France : assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis. *Lancet* 2000; 356(9232) : 789–94.
- [27] Munck A, Roussey M. The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program : strategy and results. *Arch Pediatr* 2008; 15(S1) : 1–6 203 : 592-6.
- [28] Scotet V, De Braekeleer M, Audrézet MP, et al. Prenatal detection of cystic fibrosis by ultrasonography : a retrospective study of more than 346,000 pregnancies. *J Med Genet* 2002; 39 : 443–8.
- [29] Scotet V, Duguépéroux I, Audrézet MP, et al. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis : the 18-year experience of Brittany (western France). *Prenat Diagn* 2008; 28 : 197–202.
- [30] Dumur V, Gervais R, Rigot JM, et al. Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990; 336 : 512.
- [31] Chillon M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332 : 1475–80.
- [32] Mercier B, Verlingue C, Lissens W, et al. Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 1995; 56 : 272–7.

- [33] Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reprod Biomed Online* 2010; 21 : 280–2.
- [34] Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011; 10(Suppl 2) : S86–102.
- [35] Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, et al. VX09-809-102 study group. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation : a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2014; 2(7) : 527–38.
- [36] Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis : correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med* 2013; 1(2) : 158–63.
- [37] Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med* 2010; 363(21) : 1991–2003.
- [38] Scotet V, Duguépéroux I, Saliou P, et al. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis : a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7 : 14.

ENTRAÎNEMENT 26 QCM-QCS

QCM 1

La mucoviscidose est diagnostiquée classiquement en France :

- A. Sur signes cliniques de bronchopathie chronique dans les premières années de vie
- B. Au cours du suivi échographique de la grossesse par la découverte d'un intestin hyperéchogène
- C. Par un dépistage systématique des nouveau-nés au troisième jour de vie

QCS 1

La mucoviscidose est une maladie monogénique :

- A. Qui se transmet selon un mode de transmission dominant
- B. Qui se transmet selon un mode de transmission récessif lié à l'X
- C. Qui se transmet selon un mode de transmission autosomique récessif avec une pénétrance incomplète
- D. Qui se transmet selon un mode de transmission récessif avec pénétrance complète

QCS 2

Le gène de la mucoviscidose (le gène CFTR) a été cloné :

- A. Grâce à une stratégie gène candidat
- B. Par une étude réussie de GWAS (pour *genome-wide association study*)
- C. Par une étude directe en s'appuyant sur la connaissance de la séquence de la protéine
- D. Par une stratégie de clonage positionnel

QCS 3

La fréquence des porteurs à l'état hétérozygote d'une mutation dans le gène CFTR dans la population française est de :

- A. 1/100
- B. 1/50
- C. 1/30
- D. 1/500

QCS 4

Quel est le risque pour un couple pris au hasard dans la population de donner naissance à un enfant atteint de mucoviscidose ?

- A. 1/10 000
- B. 1/4 000
- C. 1/50 000

QCS 5

Quel est le risque *a priori* de donner naissance à un enfant atteint pour un couple dont l'un des conjoints est porteur d'une mutation dans le gène CFTR :

- A. 1/60
- B. 1/120
- C. 1/240
- D. 1/500

QCS 6

Quel est le risque *a priori* d'être porteur d'une mutation dans le gène CFTR pour le frère non malade d'un sujet atteint :

- A. 1/2
- B. 2/3
- C. 1/4
- D. 1/8

QCS 7

La mutation F508del (p.Phe508del) est la mutation la plus fréquente du gène CFTR. Il s'agit :

- A. D'une mutation d'épissage
- B. D'une mutation troncatrice
- C. D'une délétion rompant le cadre de lecture
- D. D'une délétion respectant le cadre de lecture

QCS 8

La majorité des 2 000 mutations identifiées dans le gène CFTR responsable de la mucoviscidose sont des mutations :

- A. Faux-sens
- B. Non-sens
- C. Des insertions/délétions
- D. Des expansions de triplets
- E. Des grands réarrangements génomiques

► Liste des compléments en ligne

Des compléments numériques sont associés à ce chapitre (ils sont indiqués dans le texte par un picto ). Ils proposent des photos supplémentaires. Pour voir ces compléments, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 28.2

Activation du canal CFTR.

La fixation d'un ATP au niveau des domaines NBD entraîne la phosphorylation du domaine R par les PKA au niveau de résidus sérines. Cette phosphorylation produit un changement de conformation de la protéine qui permet l'ouverture du canal et ainsi le passage d'ions Cl^- .



Adaptée de www.biochemj.org/csb/frame.htm.

e-figure 28.5

Couples à risque de 1/2.



Problèmes posés par les maladies génétiques, à propos d'une maladie d'instabilité : le syndrome de l'X fragile

Gaëtan Lesca, Delphine Héron, Jean-Louis Mandel

PLAN DU CHAPITRE

Introduction	322
Particularités du mode de transmission	322
Pathologie moléculaire	322
Phénotype du syndrome de l'X fragile	324
Diagnostic génétique	324
Les atteintes associées aux prémutations du gène <i>FMR1</i>	325
Le conseil génétique	325
Le diagnostic prénatal et préimplantatoire	326
Conclusion	327



Prérequis

Connaissance des bases de transmission des maladies génétiques. Connaissances de base des maladies par expansions de nucléotides (voir chapitre 22, « Maladies génétiques fréquentes de transmission non mendélienne : les maladies associées aux mutations dynamiques »).



L'essentiel à retenir

- Le syndrome de l'X fragile est la forme la plus fréquente de déficience intellectuelle familiale.
- Dans sa forme courante, il est lié à l'expansion anormale d'une répétition de trinucleotides CGG, situé dans la région 5'UTR du gène *FMR1*.
- Il existe deux catégories d'allèles pathologiques : les prémutations contenant entre 55 et 200 CGG et les mutations complètes, au-delà de 200 CGG et associées à la l'hyperméthylation de la région promotrice. Le passage à la mutation complète survient exclusivement lors des transmissions maternelles.
- Les mutations complètes sont responsables d'une déficience intellectuelle associée à des troubles du comportement et à des caractéristiques faciales évocatrices chez les garçons, tandis que l'expression clinique est très variable chez les filles.
- Les personnes prémutées ont un risque de développer une insuffisance ovarienne prématurée (FXPOI) ou un syndrome neurodégénératif à début tardif (FXTAS), ce dernier étant plus fréquent chez les hommes.
- Le conseil génétique est primordial du fait de l'existence de nombreux conducteurs potentiels (hommes ou femmes) sur plusieurs générations et dans plusieurs branches de la famille.

Introduction

Le syndrome de l'X fragile constitue la première cause de déficience intellectuelle (DI) familiale et la deuxième cause de DI génétique après la trisomie 21. Il s'agit d'une maladie liée à l'X dont la prévalence est estimée à environ 1/5 000 chez les hommes et 1/8 000 chez les femmes [1]. Représente 2 à 3 % des DI chez le garçon et environ 1 % chez la fille. L'espérance de vie des personnes touchées paraissant normale, on peut donc estimer que 10 000 personnes seraient atteintes de DI liée à ce syndrome en France. La fréquence élevée de cette maladie, par rapport aux autres

formes de DI monogéniques, est liée à l'existence d'une répétition de trinucleotides CGG présentant un risque d'instabilité au cours des générations. La fréquence des prémutations (PM) dans la population générale est de 1/250 chez les femmes et d'environ 1/500 chez les hommes [2].

Particularités du mode de transmission

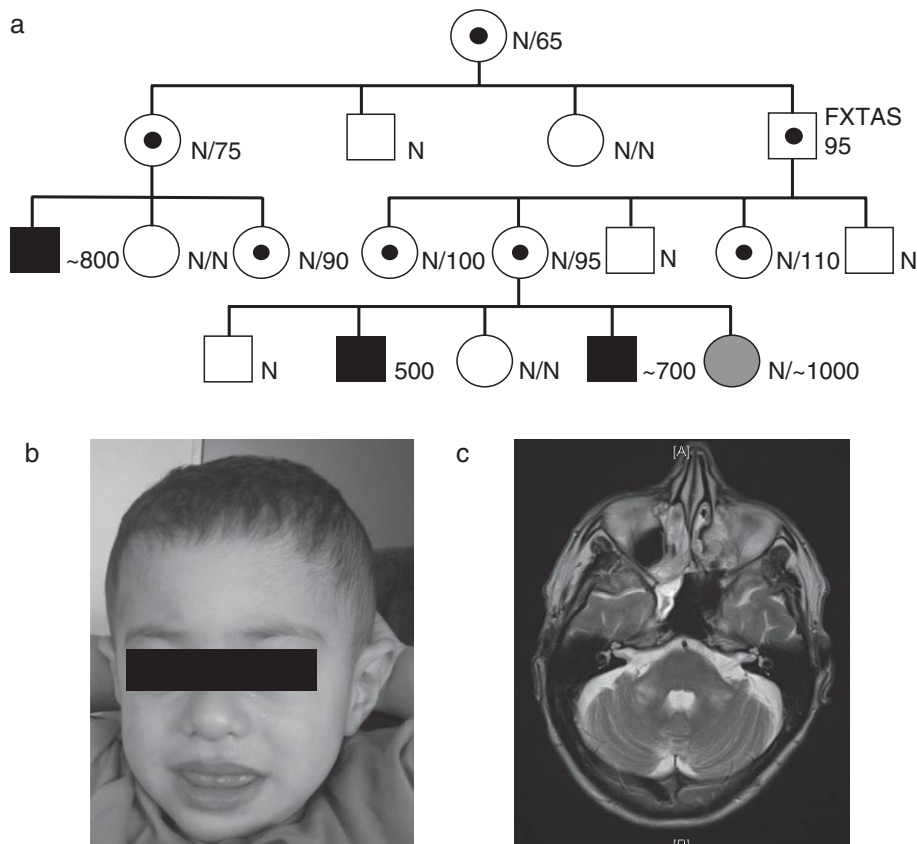
Le syndrome de l'X fragile est lié à une mutation d'un gène (*FMR1*) situé dans la partie terminale du bras long du chromosome X (Xq27). L'observation des généalogies a longtemps dérouté les généticiens, jusqu'à ce que la découverte du mécanisme de mutation par expansion en apporte l'explication (figure 29.1a). En effet, il avait été constaté sur les pedigrees des particularités inhabituelles pour une affection liée au chromosome X :

- premièrement, la maladie s'exprime chez environ 30 % des conductrices potentielles ;
- deuxièmement, il existe des conducteurs obligatoires qui n'expriment pas la maladie, comme, par exemple, le grand-père des enfants chez lesquels le diagnostic de syndrome de l'X fragile est porté ;
- enfin, on observe un phénomène dit « d'anticipation » qui correspond à l'augmentation du nombre de sujets atteints au fil des générations, ainsi qu'au fait que les femmes conductrices n'ont pas le même risque d'avoir un enfant atteint selon leur position dans la généalogie.

Ce dernier point, particulièrement intrigant a été appelé « paradoxe de Sherman », du nom de la généticienne américaine qui l'a décrit.

Pathologie moléculaire

La découverte du gène *FMR1*, en 1991, a révélé l'existence d'un mécanisme mutationnel nouveau : les mutations par expansion de répétitions trinucleotidiques [3, 4]. Le gène *FMR1* comporte 17 exons. Il présente une répétition de trinucleotides CGG dans la région 5' non traduite de l'ARN messenger. Les allèles normaux ont moins de 55 CGG et comportent, le plus souvent, 1 à 4 interruptions AGG. Par contre, les allèles des patients comportent une expansion supérieure à 200 CGG (210 à 1300), appelée mutation complète (MC) et presque toujours associée à une méthylation anormale de l'îlot CpG voisin et de la région promotrice. Cette hyperméthylation est responsable de l'inhibition de la transcription du gène *FMR1*.

**Figure 29.1****Aspects cliniques du syndrome de l'X fragile.**

A. Exemple de transmission familiale. En noir : déficience intellectuelle modérée à sévère; en gris : DI légère; chiffres : nombre de répétitions; N : allèle normal. B. Morphologie faciale d'un garçon porteur d'une mutation complète. C. Aspect caractéristique de l'IRM cérébrale d'un patient porteur du FXTAS (hypersignaux T2 des pédoncules cérébelleux moyens).

Les allèles pathologiques de la majorité des conductrices et des conducteurs asymptomatiques contiennent une prémutation (PM), comportant entre 55 et 200 CGG sans hyperméthylation. Lors de la transmission intergénérationnelle, il existe une tendance à l'expansion des PM qui peuvent augmenter de quelques trinuécléotides ou bien, et ce uniquement lors de la transmission maternelle, passer au stade de MC. Le risque d'expansion vers une MC en une génération est statistiquement corrélé à la taille de la PM maternelle. Il est très faible pour des allèles PM comportant moins de 65 répétitions, et l'expansion vers la mutation complète est quasiment systématique par transmission d'un allèle maternel prémuté comportant plus de 90 CGG. Jusqu'à présent, le plus petit allèle ayant conduit à une MC en une génération comportait 56 CGG [5]. Des études récentes ont confirmé que la présence et le nombre d'interruptions AGG représentent un facteur de stabilité lors des transmissions [6].

Toutefois, les allèles de taille intermédiaire, entre 45 à 54 répétitions peuvent être instables et susceptibles d'évoluer

vers la PM en quelques générations [7]. À côté des expansions de triplet CCG, de rares délétions de taille variable, de quelques exons à l'ensemble du gène ou les gènes voisins, sont également retrouvées chez des patients présentant un syndrome clinique d'X fragile [8]. En outre, de très rares mutations ponctuelles du gène *FMR1* ont également été rapportées [9]. Les différents types de mutations conduisent tous à une perte de fonction, la protéine FMRP (pour *fragile X mental retardation protein*) étant absente ou fortement diminuée chez les patients (par inhibition de la transcription et absence ou forte réduction de l'ARN messager). À l'état normal, cette protéine est retrouvée dans la plupart des cellules associées aux polyribosomes et peut se lier à certains ARN messagers dont elle régulerait la traduction. Dans les neurones en particulier, FMRP est impliquée dans le transport d'ARN messagers le long des dendrites. La perte de fonction de FMRP aurait pour principale conséquence une anomalie de la régulation traductionnelle de certains ARN messagers au niveau post-synaptique, entraînant des défauts de plasticité synaptique.

Phénotype du syndrome de l'X fragile (voir chapitre 13, « Génétique clinique ; Examen de l'enfant porteur d'anomalies du développement »)

Chez les garçons

Avant l'ère de la biologie moléculaire, ce qui deviendra par la suite le syndrome de l'X fragile avait été décrit en 1949 dans une grande famille multigénérationnelle sous le nom de syndrome de Martin et Bell. Ce syndrome associe une DI, des particularités morphologiques faciales (souvent discrètes chez le jeune enfant et s'accroissant avec l'âge) (figure 29.1b) caractérisées par un visage allongé et étroit, un prognathisme, un front haut et large, des oreilles décollées, des lèvres épaisses et éversées, un palais ogival, des malpositions dentaires et une macro-orchidie post-pubertaire fréquente. Les patients peuvent présenter d'autres signes cliniques comme une avance staturale, une macrocéphalie relative, une hyperlaxité distale (en particulier des métacarpo-phalangiennes), des pieds larges et plats, un prolapsus mitral (sans conséquence importante sur la fonction cardiaque en général), un strabisme ou une myopie. Il est parfois observé, chez les nourrissons, un aspect cerné des yeux. Les aspects morphologiques sont variables et inconstants.

Les acquisitions motrices sont peu altérées chez les patients et l'alerte est souvent donnée par le retard de langage. Le quotient intellectuel est variable, mais range le plus souvent les garçons atteints dans le champ de la DI modérée à sévère (QI < 50). Certains patients, porteurs de génotypes particuliers (mosaïques PM/MC ou méthylation incomplète) présentent des troubles spécifiques des apprentissages ou des troubles émotionnels avec un QI > 70 mais hétérogène. Il existe une corrélation entre les capacités cognitives et le taux résiduel de protéine FMRP. Les patients présentent souvent un déficit attentionnel, une hyperactivité ou une impulsivité, une intolérance à la frustration, une anxiété et une timidité (avec évitement du regard) et, parfois, des troubles du spectre autistique et des troubles du sommeil. Il semble exister un déclin progressif des performances avec l'âge, mais ce phénomène pourrait être en partie lié au fait que les structures de prise en charge sont moins développées pour les patients adultes que pour les enfants.

Une épilepsie est présente chez 20 % des garçons atteints, débutant habituellement après deux ans, pharmacosensible, à crises spontanément rares, généralisées ou

focales. L'EEG révèle fréquemment la présence des pointes intercritiques dans les régions centro-temporales, activées pendant le sommeil, dont l'apparition et la disparition sont liées à l'âge, comme dans l'épilepsie à paroxysmes rolandiques. Enfin, les patients présentent fréquemment des otites, qu'il est d'autant plus important de diagnostiquer et de traiter qu'elles peuvent conduire à une hypoacousie qui aggrave les troubles de communication.

Chez les filles et les femmes conductrices

Environ 60 % des femmes porteuses d'une MC présentent des difficultés cognitives de sévérité très variable (QI entre 50 et 70), habituellement moins grave que chez les garçons, les 40 % restant ayant en général un QI se situant en moyenne dans la partie basse de la distribution normale. Les troubles cognitifs sont souvent associés à des troubles relationnels (timidité) ou une anxiété. Il n'est en revanche pas rare de retrouver, *a posteriori*, des antécédents de difficultés scolaires ou professionnelles chez une mère chez laquelle on retrouve la MC préalablement mise en évidence chez son fils. Les éléments morphologiques sont rarement présents.

Diagnostic génétique (voir chapitre 10, « Principales techniques d'analyse des anomalies génétiques à l'échelle du gène »)

Les études cytogénétiques furent les premières à permettre la confirmation biologique du diagnostic du syndrome de l'X fragile et sont à l'origine du nom de la maladie. Elles ont aidé à la localisation du gène *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*) situé en Xq27.3. Chez les garçons atteints, une cassure de cette région (locus FRAXA) est observée sur 5 à 40 % des mitoses, lorsque les lymphocytes sont cultivés dans un milieu pauvre en acide folique. Depuis la découverte du gène *FMR1*, cette technique n'est plus utilisée en diagnostic, d'une part car elle est fastidieuse et nécessite l'analyse d'un grand nombre de mitoses et, d'autre part, parce qu'il existe un chevauchement des taux de cassures observés chez les patients et les témoins. De plus, les cassures sont plus rares chez les personnes prémutées, ce qui rendait le conseil génétique peu fiable.

L'identification du gène *FMR1* a permis la compréhension du « paradoxe de Sherman » et un accès au diagnostic moléculaire. Toutefois, la nature des répétitions CGG a longtemps rendu les PM de grande taille et les MC réfractaires aux techniques basées sur la PCR. Le *Southern blot* (une technique assez délicate et relativement longue) est donc resté longtemps la technique de référence. Grâce à l'utilisation d'une enzyme de restriction sensible à la méthylation (EagI), il permettait de plus d'apprécier le degré de méthylation des MC. Ces dernières années, plusieurs techniques alternatives efficaces, basées sur la PCR, ont été développées. La technique AmpliX (Asuragen), par exemple, a été optimisée de façon à amplifier la plupart des MC et permet également d'évaluer le nombre de triplets AGG grâce à une amorce interne (CGG)_n (e-figure 29.2) [10]. L'utilisation de ces nouvelles techniques a également montré la fréquence non négligeable de mosaïques PM/MC pour la détection desquelles le *Southern blot* n'était pas assez sensible [7].

Les délétions du gène *FMR1* peuvent être détectées par CGH-array, si elles sont supérieures au seuil de détection de la technique tandis que l'identification des très rares mutations ponctuelles est maintenant possible grâce au séquençage à haut débit [11].

Les atteintes associées aux prémutations du gène *FMR1*

Longtemps méconnues, elles sont de description relativement récente. Deux phénotypes principaux ont été individualisés : FXTAS, plus fréquent chez les hommes, et IOP chez les femmes.

Le FXTAS

Ce syndrome n'a été reconnu qu'en 2001, soit 10 ans après la découverte du gène *FMR1* [14]. Le FXTAS (pour *fragile X associated tremor ataxia syndrome*) est retrouvé chez environ 40 % des hommes et 16 % des femmes porteuses de PM, au-delà de 60 ans [15]. Il associe de façon très variable un tremblement d'action ou de repos, une ataxie cérébelleuse, un syndrome parkinsonien, des myoclonies, des troubles cognitifs, des troubles psychiatriques variés (anxiété surtout) et une neuropathie sensitive. Les manifestations initiales et l'évolution sont très variables. L'IRM cérébrale est le plus souvent anormale; les anomalies les plus caractéristiques sont les hypersignaux des pédoncules cérébelleux moyens et/ou du splénium du corps calleux

(figure 29.1c). Le risque de FXTAS augmente surtout chez les porteurs de PM au-delà de 70 CGG [16]. Les patients X fragiles porteurs de mosaïques PM/MC ou de méthylation incomplète encourent également un risque de FXTAS [17]. Les mécanismes pathologiques supposés sont la toxicité neuronale de l'ARNm prémuté dont le taux d'expression est augmenté chez ces patients, ainsi que la diminution du taux de FMRP, qui devient manifeste au-delà de 110 CGG.

Les troubles du neurodéveloppement

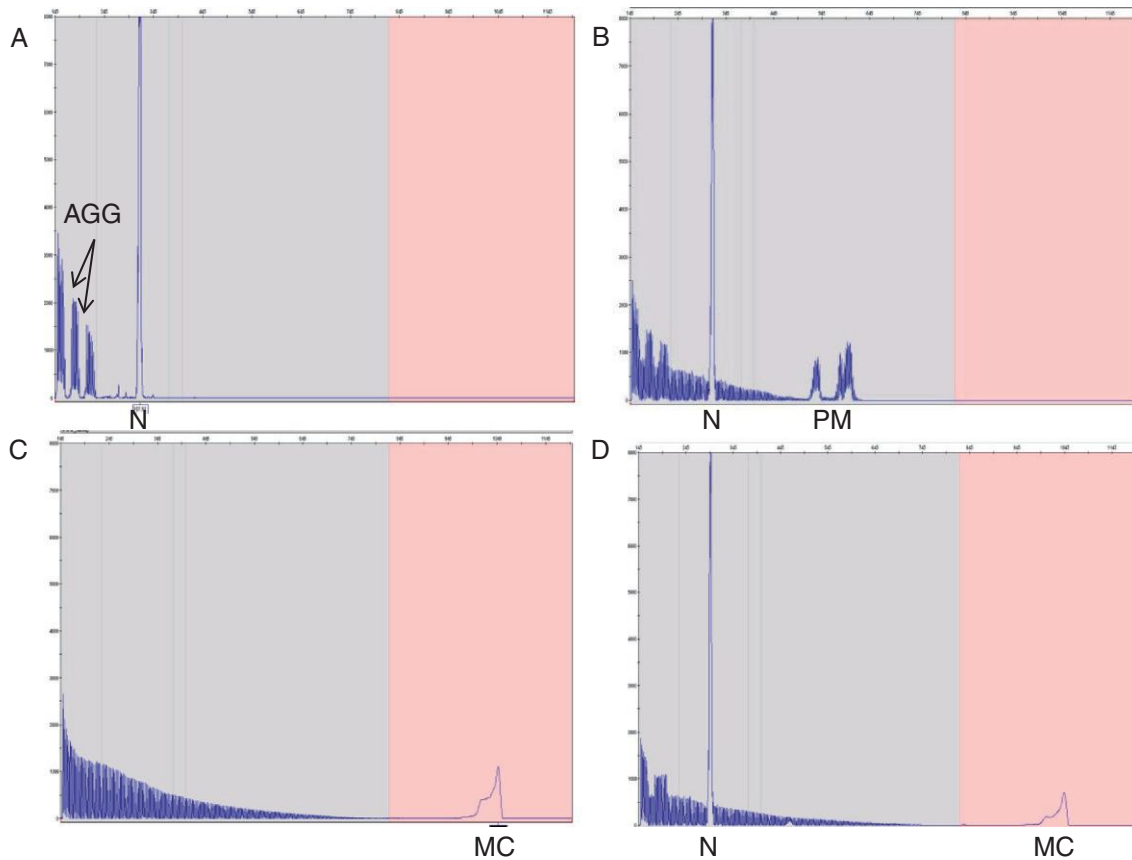
Les porteurs masculins de PM pourraient présenter un risque plus important de développer des troubles de l'attention, une hyperactivité ou des troubles du spectre autistique que dans la population générale [12]. Les conductrices auraient également une augmentation de risque pour certaines affections, au premier rang desquelles viennent les troubles anxiodépressifs [13].

L'insuffisance ovarienne prématurée

Environ 20 % des porteuses de PM (mais pas de MC) ont un risque de développer une insuffisance ovarienne prématurée, c'est-à-dire avant l'âge de 40 ans, appelée FXPOI (pour *fragile X-associated primary ovarian insufficiency*) et pouvant conduire à une ménopause précoce [18]. Il existe une relation curvilinéaire entre le nombre de CGG et le risque de FXPOI; celui-ci augmente entre 70 et 100 CGG puis diminue au-delà. La survenue d'une ménopause précoce avant 40 ans peut donc justifier un test de mise en évidence d'une expansion CGG, même en l'absence d'histoire familiale de syndrome de l'X fragile.

Le conseil génétique (voir le chapitre 12, « Conseil génétique »)

Contrairement à la plupart des autres formes de DI liées à l'X, dont les mutations peuvent survenir *de novo*, le syndrome de l'X fragile est toujours héréditaire quand il est lié à une expansion CGG. De plus, les PM peuvent être transmises tant par des femmes que par des hommes. Le fait de porter le diagnostic de syndrome de l'X fragile chez un patient indique l'existence de conducteurs et conductrices potentielles, pouvant être exposés au risque de transmettre le syndrome de l'X fragile à leur descendance et à celui de développer un



e-figure 29.2

Aspects moléculaires du syndrome de l'X fragile. Exemple de profils observés à l'aide de la technique AmpliDeX, sur séquenceur capillaire. Les amorces spécifiques amplifient une région contenant la région répétée. L'amorce interne, comportant un motif CGG, sur fixe sur toutes les positions sauf les interruptions AGG.

A. Homme porteur d'un allèle de taille normale (N) comportant deux interruptions AGG. B. Femme porteuse d'un allèle normal comportant deux interruptions AGG et d'un allèle porteur d'une mosaïque comportant plusieurs prémutations de tailles différentes. C. Homme porteur d'une mutation complète. D. Femme porteuse d'un allèle normal comportant une interruption AGG et d'une mutation complète.

FXTAS ou un FXPOI. Ce risque varie selon leur sexe, leur âge et leur statut génétique. Après confirmation du statut de conductrice obligatoire de la mère du patient, il est en général proposé d'établir celui des grands-parents maternels, ce qui permet de cibler la branche familiale à risque et de proposer un conseil génétique en cascade (figure 29.3). Il ne faut pas oublier qu'un tel test génétique peut avoir une valeur prédictive par rapport au risque de FXTAS. Conformément à la loi de bioéthique, le test génétique n'est pas recommandé chez les mineurs asymptomatiques. Des précautions sont également à prendre en ce qui concerne les adultes jeunes, car l'impact et les conséquences du test génétique sont très différents chez une jeune femme et chez un jeune homme. Une jeune femme, présentera, en cas de PM, un risque d'insuffisance ovarienne précoce, un risque de transmission à ses enfants du syndrome de l'X fragile, et un risque de FXTAS. L'annonce du risque d'insuffisance ovarienne est souvent perçue comme une menace plus proche, les attei-

gnant dans leur corps et les mettant en situation de responsabilité vis-à-vis de leurs choix procréatifs. Il est bénéfique de les orienter vers une consultation spécialisée d'endocrinologie pour estimer la réserve ovarienne, et proposer un suivi hormonal. Une cryoconservation ovarienne peut être discutée. En outre, il ne faut pas sous-estimer l'impact de la découverte d'une MC chez une jeune fille ayant présenté des symptômes non spécifiques (ex. : difficultés scolaires) et qui demande le test moléculaire dans un cadre de conseil génétique pour sa descendance. Les hommes jeunes, en revanche, n'ont pas de risque de transmission de la mutation complète à leurs enfants, mais transmettent leur PM à leurs filles de façon quasi systématique (une contraction de la répétition CGG peut parfois survenir). En outre, ces personnes ont un risque de développer un FXTAS au cours de leur existence et la demande de test génétique peut s'apparenter à un test présymptomatique.

Une situation non exceptionnelle est la découverte d'une PM de petite taille ou d'un allèle de taille intermédiaire chez un patient présentant une DI. Ce résultat n'explique pas les symptômes du patient mais un conseil génétique est recommandé à partir de 50 répétitions du fait du risque d'instabilité aux cours des transmissions ultérieures [6].

Le diagnostic prénatal et préimplantatoire (voir chapitre 15, « Diagnostic prénatal et préimplantatoire »)

L'un des enjeux de la confirmation du diagnostic moléculaire chez le cas index est de permettre aux parents et aux autres couples à risque de la famille de demander un diagnostic un diagnostic prénatal (DPN) ou un préimplantatoire (DPI) lors d'une future grossesse. Le risque pour une conductrice d'avoir un enfant atteint est dépendant de son statut génétique. Il est de 50 % pour les MC. Le risque d'expansion d'une PM vers la MC en une seule génération varie en fonction de sa taille PM; il est de 94 % au-delà de 90 CGG. L'étude du nombre d'interruptions AGG peut permettre d'affiner l'évaluation du risque, en particulier lorsque la PM a été découverte de façon « fortuite » chez un patient présentant une DI [7]. L'un des points très délicats du DPN concerne les décisions d'IMG pour un fœtus de sexe féminin porteur d'une MC puisqu'il n'est pas possible de prédire s'il y aura ou non une d'atteinte cognitive, ni sa sévérité. La réalisation d'une étude du sexe fœtal dans le sang maternel à 10 SA peut être proposée, permettant au couple de prendre une décision en fonction du sexe et de

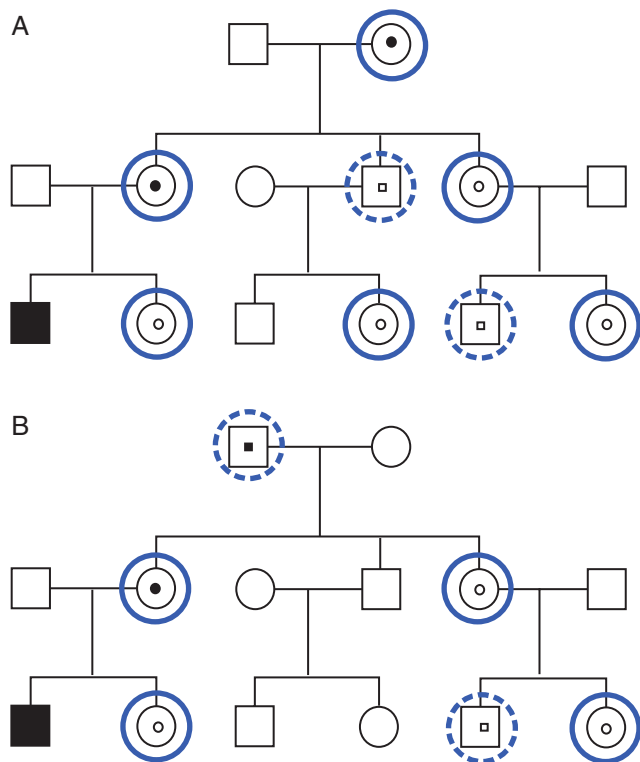


Figure 29.3

Conseil génétique en cascade dans la famille d'un cas index porteur du syndrome de l'X fragile.

Les deux généalogies illustrent les personnes qui sont conductrices obligatoires (rond centré noir) ou potentielles (rond centré blanc) si l'allèle pathologique a été transmis par la grand-mère (A) ou par le grand-père (B). Les femmes conductrices peuvent transmettre une mutation complète à leurs enfants (cercles bleus) tandis que pour les hommes conducteurs, ce risque est reporté à la génération suivante (cercles bleus en pointillés), à la descendance de leurs filles.

ne faire un geste invasif que lorsqu'il s'agit d'un garçon. Le DPI peut être une alternative au DPN, en particulier chez les femmes présentant une insuffisance ovarienne débutante et qui souhaitent avoir recours à la PMA.

Conclusion

Le syndrome de l'X fragile, dans sa forme courante liée aux expansions CGG, est la cause la plus fréquente de DI héréditaire. Les particularités de son mode de transmission et les divers phénotypes associés à la MC d'une part et à la PM d'autre part rendent le CG particulièrement délicat. Une fois le diagnostic confirmé chez un cas index présentant une DI, un FXTAS ou une FXPOI, il est capital de procéder à l'information aux apparentés à risque et de leur proposer un conseil génétique adapté à la problématique de chacun.

Références

- [1] Biancalana V, Beldjord C, Taillandier A, et al. Five years of molecular diagnosis of Fragile X syndrome (1997-2001) : a collaborative study reporting 95 % of the activity in France. *Am J Med Genet* 2004; 129A : 218–24.
- [2] Tassone F, Long KP, Tong TH, et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Med* 2012; 4 : 100.
- [3] Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252 : 1097–102.
- [4] Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability : resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67 : 1047–58.
- [5] Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, et al. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn* 2009; 11 : 306–10.
- [6] Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in pre-mutation carriers. *Genet Med* 2015; 17(5) : 358–64.
- [7] Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(4) : 417–25.
- [8] Gedeon AK, Baker E, Robinson H, et al. Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nat Genet* 1992; 1 : 41–4.
- [9] De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 1993; 3 : 31–5.
- [10] Chen L, Hadd A, Sah S, et al. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. *J Mol Diagn* 2010; 12 : 589–600.
- [11] Redin C, Gérard B, Lauer J, et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2014; 51 : 724–36.
- [12] Bailey Jr. DB, Raspa M, Olmsted M, et al. Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations : Findings from a national parent survey. *Am J Med Genet* 2008; 146A : 2060–9.
- [13] Bourgeois JA, Seritan AL, Casillas EM, et al. Lifetime prevalence of mood and anxiety disorders in fragile X premutation carriers. *J Clin Psychiatry* 2011; 72 : 175–82.
- [14] Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, et al. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2001; 57 : 127–30.
- [15] Apartis E, Blancher A, Meissner WG, et al. FXTAS : new insights and the need for revised diagnostic criteria. *Neurology* 2012; 79 : 1898–907.
- [16] Sévin M, Kotalik Z, Bergman S, et al. Penetrance of marked cognitive impairment in older male carriers of the FMR1 gene premutation. *J Med Genet* 2009; 46 : 818–24.
- [17] Pretto D, Yrigollen CM, Tang HT, et al. Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. *Front Genet* 2014; 5 : 318.
- [18] Mailick MR, Hong J, Greenberg J, et al. Curvilinear association of CGG repeats and age at menopause in women with FMR1 premutation expansions. *Am J Med Genet* 2014; 165B : 705–11.

ENTRAÎNEMENT 27 QCM-QCS

QCM 1

Concernant le syndrome de l'X fragile, quelles sont les propositions vraies ?

- A. Il s'agit de la forme de déficience intellectuelle d'origine génétique la plus fréquente
- B. La macro-orchidie est un élément essentiel du diagnostic chez les jeunes garçons
- C. Les patients présentent souvent des troubles du spectre autistique
- D. Certains patients ont un QI dans les normes
- E. Les conductrices peuvent présenter une déficience intellectuelle

QCM 2

Concernant les prémutations du gène *FMR1*, quelles sont les propositions vraies ?

- A. Elles correspondent aux allèles comportant 55 à 250 répétitions CGG
- B. Le risque qu'elles soient transmises par un homme porteur à toutes ses filles est proche de 100 %

C. Elles sont associées à un risque d'insuffisance ovarienne prématurée

D. Le risque de syndrome neurodégénératif à début tardif (FXTAS) ne concerne que les hommes

E. Elles peuvent passer à la mutation complète lors d'une transmission paternelle

QCS 1

Concernant le syndrome de l'X fragile, quelles sont les propositions vraies ?

A. Il est peut-être causé par une mutation ponctuelle du gène *FMR1*

B. Les mutations surviennent le plus souvent *de novo*

C. La CGH-array confirme le diagnostic chez la plupart des patients

D. Les caractéristiques faciales ne sont ni constantes ni spécifiques

E. Le diagnostic prénatal peut être proposé à une femme dont le conjoint est porteur d'une prémutation

► Complément en ligne

Un complément numérique est associé à ce chapitre (il est indiqué dans le texte par un picto ). Il propose une photo supplémentaire. Pour voir ce complément, connectez-vous sur www.em-consulte/e-complement/474521 et suivez les instructions.

e-figure 29.2

Aspects moléculaires du syndrome de l'X fragile. Exemple de profils observés à l'aide de la technique AmpliX, sur séquenceur capillaire.

Les amorces spécifiques amplifient une région contenant la région répétée. L'amorce interne, comportant un motif CGG, sur fixe sur toutes les positions sauf les interruptions AGG.

A. Homme porteur d'un allèle de taille normale (N) comportant deux interruptions AGG. B. Femme porteuse d'un allèle normal comportant deux interruptions AGG et d'un allèle porteur d'une mosaïque comportant plusieurs prémutations de tailles différentes. C. Homme porteur d'une mutation complète. D. Femme porteuse d'un allèle normal comportant une interruption AGG et d'une mutation complète.



Partie

VIII

Corrigé

This page intentionally left blank

Corrigé des entraînements

PLAN DU CHAPITRE

Entraînement 1	332	Entraînement 15	334
Entraînement 2	332	Entraînement 16	334
Entraînement 3	332	Entraînement 17	334
Entraînement 4	332	Entraînement 18	334
Entraînement 5	332	Entraînement 19	335
Entraînement 6	332	Entraînement 20	335
Entraînement 7	333	Entraînement 21	335
Entraînement 8	333	Entraînement 22	337
Entraînement 9	333	Entraînement 23	337
Entraînement 10	333	Entraînement 24	337
Entraînement 11	333	Entraînement 25	337
Entraînement 12	333	Entraînement 26	337
Entraînement 13	334	Entraînement 27	337
Entraînement 14	334		

Entraînement 1

Chapitre 1

QCM 1 : A, C, E

QCM 2 : A, B, C, D

QCM 3 : A, E

QCM 4 : D, E

QCS 1 : E

Entraînement 2

Chapitre 2

QCM 1 : A, B, E

QCM 2 : A, C, D, E

QCM 3 : A, D, E

QCM 4 : A, B, C, D

QCM 5 : A, B, E

QCM 6 : B, C, D

QCM 7 : B, C, D, E

QCM 8 : A, B, E

QCM 9 : B, C, E

QCM 10 : A, B, D, E

Entraînement 3

Chapitre 3

Le projet « Génome humain »

QCM 1 : A, C, D

QCM 2 : A, E

QCM 3 : B, D

QCM 4 : A, B, C, E

QCM 5 : B, C, D, E

QROC 1 : Une banque de BAC (*bacterial artificial chromosomes*) a été criblée à partir de marqueurs polymorphes localisés sur la carte génétique et d'autres marqueurs non polymorphes dont la localisation était connue. Ceci a permis d'ancrer les BAC le long des chromosomes jusqu'à couvrir chaque chromosome à l'aide de BAC ordonnés. Chacun de ces BAC a alors été séquencé individuellement. Pour cela, chaque BAC (qui comporte un fragment génomique de 100 à 150 kb) a été coupé en petits morceaux chevauchants de quelques centaines de paires de bases qui ont été séquencés. Les séquences ont été assemblées jusqu'à reconstituer la séquence complète de chaque BAC.

L'assemblage des séquences de tous les BAC a permis d'obtenir la séquence de chaque chromosome et, par là même, celle de l'ensemble du génome humain.

ADN codant et non codant dans le génome humain

QCM 1 : A, C, D

QCM 2 : B, C, D

QCM 3 : A, B, D, E

QCM 4 : B, C, D, E

QCM 5 : C, E

QCM 6 : A, B, D, E

Polymorphisme du génome humain

QCM 1 : A, D

QCM 2 : B, D, E

QCM 3 : A, B, D

QCM 4 : A, C, D

QCM 5 : A, D

QCM 6 : A, B, C, E

Entraînement 4

Chapitre 4

QCM 1 : B, D

QCM 2 : B, E

Entraînement 5

Chapitre 5

QCM 1 : B, E

QCM 2 : B, C

QCS 1 : D

QCS 2 : E

QCS 3 : C

Entraînement 6

Chapitre 6

QCM 1 : A, C, D

QCM 2 : A, D

QCM 3 : B, C

QCM 4 : A, C, D
 QCM 5 : A, B, D
 QCM 6 : A, C
 QCS 1 : B
 QCS 2 : B

QCM 7 : B, C, D
 QCM 8 : B, D
 QCS 1 : E
 QCS 2 : E
 QCS 3 : A

Entraînement 7

Chapitre 7

QCM 1 : A, B
 QCM 2 : B, D
 QCM 3 : A, C, E
 QCS 1 : A

Entraînement 8

Chapitre 8

Hémopathies malignes

QCS 1 : E
 QCS 2 : D

Tumeurs solides

QCM 1 : B, D
 QCM 2 : A, B, D
 QCM 3 : A, C, D
 QCS 1 : C

Divers

QCM 1 : A, B

Entraînement 9

Chapitre 9

QCM 1 : A, C, D
 QCM 2 : A, B, E
 QCM 3 : A, B, C, D, E
 QCM 4 : A, B, C, E
 QCM 5 : B, C
 QCM 6 : A, B, C

Entraînement 10

Chapitre 10

QCM 1 : A, B, C, D
 QCM 2 : A, B, C, D, E
 QCM 3 : A, B, D, E
 QCM 4 : A, B, C, D
 QCM 5 : A, B, D
 QCM 6 : A, B, C, E
 QCM 7 : A, B, C, D, E
 QCM 8 : A, C, D
 QCM 9 : C, D
 QCM 10 : A, C, E
 QCM 11 : A, B
 QCM 12 : C, D, E
 QCM 13 : B, C, D, E
 QCS 1 : C

Entraînement 11

Chapitre 11

QCM 1 : B, C, E
 QCM 2 : A, B, D
 QCM 3 : A, E
 QCM 4 : B, C, D
 QCM 5 : A, D, E
 QCM 6 : B, C
 QCM 7 : A, D, E
 QCM 8 : C, D, E
 QCM 9 : A, B, D, E
 QCM 10 : A, C, E

Entraînement 12

Chapitre 12

QCM 1 : D, E

Entraînement 13

Chapitre 13

QCM 1 : A, B

QCS 1 : B

QCS 2 : C

QCS 3 : B

QCS 4 : E

QCS 5 : D

Entraînement 14

Chapitre 14

QCM 1 : B, D

QCM 2 : D, E

Entraînement 15

Chapitre 15

QCM 1 : B, C, E

QCM 2 : B, C, E

QCM 3 : A, C, E

QCM 4 : A, B, C

QCM 5 : A, C, E

Entraînement 16

Chapitre 16

QCM 1 : B, C, E

QCM 2 : B, D, E

QCM 3 : A, B, C, E

QCM 4 : A, C, D

QCM 5 : A, B, D, E

Entraînement 17

Chapitre 17

QCM 1 : B, C, D

QCM 2 : B, D

QCM 3 : A, C, D, E

QCS1 : A

Entraînement 18

Chapitre 18

QROC 1 :

- primauté de l'individu sur la société;
- partage de l'information au sein de la famille;
- droit à l'information;
- recueil du consentement par écrit;
- protection des personnes incapables de consentir;
- droit de ne pas savoir;
- utilité clinique et qualité des tests;
- droit à un suivi médical individualisé et au conseil génétique;
- respect de la confidentialité et de la vie privée;
- égalité d'accès aux soins.

QROC 2 :

- avant la réalisation du test, une information détaillée doit être délivrée à la personne lors d'une consultation individuelle, en face-à-face avec un médecin spécialisé connaissant la maladie et ses aspects génétiques;
- cette information devra être « loyale, claire, appropriée » et adaptée au niveau de compréhension afin de permettre une décision éclairée;
- elle sera complétée, en expliquant le caractère héréditaire des maladies génétiques et le devoir de transmettre, le cas échéant, l'information aux apparentés.

QROC 3 :

- à l'issue des analyses, sauf volonté exprimée d'être tenue dans l'ignorance du diagnostic, le patient est informé des résultats obtenus de façon « loyale, claire, appropriée » et adaptée au niveau de compréhension;
- seul le médecin prescripteur est habilité à rendre ces résultats lors d'une consultation individuelle;
- les éléments d'informations communiqués doivent être résumés dans un document écrit.

QROC 4 : dans le cas de maladies héréditaires. La situation qui impose de se préoccuper d'informer la parentèle est ainsi décrite : « si une anomalie génétique grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention, y compris de conseil génétique, ou de soins était diagnostiquée. »

QROC 5 : ce devoir d'information de la parentèle échoit en priorité au consultant. Le médecin doit aider la personne à transmettre l'information aux membres de sa famille, en désignant les personnes à risque et en remettant un résumé écrit des données à transmettre. Si la personne ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille, elle peut demander par écrit au médecin prescripteur de procéder à cette information.

QROC 6 :

- le recueil du consentement de leurs représentants légaux est nécessaire, à savoir pour les mineurs, les titulaires de l'autorité parentale et, pour les majeurs sous tutelle, le tuteur;
- dans tous les cas, leur assentiment à la réalisation de l'examen est également recherché, dans la mesure du possible, en fonction de leur degré de maturité et/ou de leur capacité de discernement;
- les examens peuvent être prescrits chez un mineur ou chez un majeur sous tutelle si celui-ci ou sa famille peuvent personnellement bénéficier de mesures préventives ou curatives immédiates.

Entraînement 19

Chapitre 19

QROC 1 : le terme d'eugénisme a été inventé en 1883 par Francis Galton, cousin de Charles Darwin. Étymologiquement, on retrouve les termes grecs : *eu* qui signifie « bon » et *genos* qui signifie « naissance ». Ce mot désigne l'ensemble des méthodes (biologiques, génétiques, etc.) et pratiques (médicales, sociales, morales, etc.) dont l'objectif est d'améliorer le patrimoine génétique de l'espèce humaine.

QROC 2 : en effet, en France, depuis la loi du 17 janvier 1975 (loi Veil), l'interruption de grossesse pour motif médical (IMG) est possible à tout moment de la grossesse, en particulier lorsqu'il existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité, reconnue comme incurable au moment du diagnostic.

QROC 3 :

- discussion collégiale pour toute décision d'IMG et toute indication de recours au DPI;
- missions d'expertise (sur la conduite à tenir en cas de suspicion d'une affection fœtale);
- mission de santé publique (organiser des actions de formation, favoriser l'égal accès de tous au DPN et au DPI).

QROC 4 :

- discussion transdisciplinaire (praticiens en gynécologie-obstétrique, échographie obstétricale, génétique médicale et néonatalogie/pédiatrie, psychologues, conseillers en génétique, etc.);
- prise en compte de l'avis de la femme enceinte après qu'elle ait été correctement informée;
- analyse au cas par cas, de façon contextualisée;
- respect de la loi de bioéthique.

QROC 5 :

- s'interroger sur les procédures d'information et de recueil du consentement en situation d'incertitude;
- harmoniser des pratiques entre laboratoires par le biais de guidelines;
- définir les compétences et l'expertise à acquérir (pour les biologistes en charge du rendu des résultats mais aussi pour les prescripteurs en charge de l'information);
- organiser échanges et collaborations entre les cliniciens prescripteurs et les biologistes pour une juste interprétation des données du séquençage dans le meilleur intérêt du patient.

Entraînement 20

Chapitre 20

QCM 1 : A, D, E

QCM 2 : A, B, C

QCM 3 : B, D

QCM 4 : A, D, E

QCM 5 : B, D, E

QCM 6 : C, D, E

QCM 7 : A, B, D

QCS 1 : C

Entraînement 21

Chapitre 22

QCM 1 :

A. Faux. Les répétitions en cause dans les gènes responsables de ces maladies sont polymorphiques dans la population générale. Il existe un seuil d'instabilité et un seuil de pathogénicité et les allèles au-dessus du seuil d'instabilité sont considérés comme anormaux (et parfois nommés prémutation, par exemple dans le cas du gène impliqué dans le syndrome de l'X fragile). Une néomutation serait le passage d'un allèle normal à un allèle au-dessus du seuil de pathogénicité, ce qui n'est pas observé.

B. Faux. Le mécanisme pathologique peut être un gain de propriété toxique de la protéine mutée mais aussi un gain de propriété toxique de l'ARN ou encore une perte de fonction du gène.

C. Faux. Les mutations peuvent se situer dans les régions promoteurs, les régions 5' et 3' transcrites mais non traduites, ainsi que dans les introns des gènes.

D. Vrai. Par ailleurs, le risque d'avoir un enfant atteint augmente de génération en génération pour le cas par exemple du syndrome X fragile.

QCM 2 :

A. Faux. Le mécanisme pathologique en cause dans FXS est une perte de fonction du gène lié à un nombre de répétitions supérieur à 200 CGG, associé à une méthylation anormale de la région promoteur. Il y a perte de fonction chez les deux frères.

B. Vrai. La femme I.2 a 50 % de probabilité de transmettre son allèle normal à chaque grossesse. Si elle transmet son allèle prémuté, il peut rester prémuté ou subir une transition en mutation complète. La probabilité de transition augmente avec la taille de l'allèle maternel et est de 100 % au-delà d'une prémutation maternelle de 100 CGG.

C. Faux. La femme I.2 a pu hériter sa prémutation de son père ou de sa mère. La prémutation est liée au syndrome neurologique FXTAS avec une pénétrance incomplète. Une recherche de prémutation couplée à un bilan clinique incluant une IRM cérébrale peut être proposée au père de I.2 pour déterminer si un FXTAS peut être à l'origine de ses troubles.

D. Faux. Environ la moitié des filles porteuses d'une mutation complète seront atteintes du FXS et en général avec une atteinte plus modérée que celle observée chez les garçons. Il n'est pas possible de préciser le pronostic en diagnostic prénatal.

QCM 3 :

A. Faux. L'un des parents est effectivement porteur car il n'y a pas de néomutation mais seules les femmes peuvent transmettre une mutation complète : la mère d'un patient atteint du FXS est conductrice obligatoire, quel que soit le sexe du patient. Elle peut être prémutée ou bien mutée (même si elle ne présente pas de déficience intellectuelle). Sans besoin de tester II.3 au préalable, il y a lieu d'informer II.2 de son risque *a priori* d'être conductrice.

B. Vrai. Si II.3 est prémutée, elle a reçu sa prémutation de son père I.1 ou de sa mère I.2. Un homme prémuté transmet sa prémutation à toutes ses filles (car *FMR1* est sur le chromosome X) donc le risque pour II.1 serait de 100 %. Une femme prémutée transmet sa prémutation dans 50 % des cas. Sans connaître l'origine parentale de la prémutation de II.3, le risque pour sa sœur de l'avoir héritée aussi est donc de 75 %.

C. Vrai. Les femmes porteuses d'une prémutation peuvent présenter une insuffisance ovarienne précoce et notamment 20 % d'entre elles présentent une ménopause précoce.

D. Faux. Il est vrai que la mutation ne rétracte pratiquement jamais, mais :

- les garçons atteints de FXS n'ont pratiquement jamais d'enfants du fait de leur atteinte cognitive. Dans les rares cas décrits, leurs fils sont normaux (héritent du chromosome Y) et leurs filles sont prémutées (du fait d'une rétraction de la répétition durant la spermatogénèse);
- la moitié des fils et filles des femmes porteuses d'une mutation complète héritent l'allèle maternel normal.

QCM 4 :

A. Vrai. Les deux sexes sont atteints et transmettent la maladie et on observe également une transmission verticale père-fils.

B. Vrai. Le mode de transmission est autosomique dominant et la pénétrance complète

C. Faux. En France, le diagnostic prénatal est autorisé. La maladie de Huntington est une maladie qui répond aux critères de réalisation d'un diagnostic prénatal : « maladie d'une particulière gravité, incurable au moment du diagnostic ». Par ailleurs 6 % des patients présentent une forme juvénile.

D. Faux. L'individu II.7 est à risque d'être porteur de la mutation familiale mais pas encore malade.

QCM 5 :

A. Faux. L'individu II.3 peut avoir hérité la mutation maternelle et déclarer la maladie dans les années à venir. Dans la maladie de Huntington, il existe un biais paternel d'anticipation, avec un risque d'avoir un enfant atteint d'une forme juvénile, qui peut donc déclarer la maladie avant son père.

B. Faux. Il existe une corrélation entre le nombre de répétitions et l'âge d'apparition de la maladie, mais une prédiction individuelle n'est pas possible, exceptée pour les tailles de mutations les plus petites ou les plus grandes qui sont associées à une expression tardive ou juvénile.

C. Faux. L'enfant III.4 peut avoir hérité la mutation paternelle sans biais majeur d'instabilité et déclarer une forme adulte de la maladie.

D. Faux. Le diagnostic présymptomatique est autorisé chez les mineurs seulement en cas de bénéfice pour la prise en charge ou un traitement avant l'âge de 18 ans, ce qui n'est pas le cas de la maladie de Huntington.

QCM 6 :

A. Faux. Les signes cliniques observés et l'aggravation de génération en génération sont fortement évocateurs d'une myotonie de Steinert et du phénomène d'anticipation.

B. Vrai. Le nombre de répétitions CTG est corrélé à l'expression de la maladie (âge d'apparition et gravité).

C. Faux. Le risque de transmettre l'allèle maternel avec la mutation est de 50 % et lors d'une transmission maternelle, il y a un risque d'instabilité majeur et un risque d'avoir un enfant atteint de la forme congénitale. La forme congénitale n'est pas exceptionnelle.

D. Faux. Il existe une corrélation entre le nombre de répétitions CTG et la forme clinique, mais une prédiction individuelle n'est pas possible.

QCM 7 :

A. Faux. C'est la plus fréquente des dystrophies musculaires de l'adulte.

B. Vrai. C'est le cas pour la forme minimale à début tardif.

C. Vrai. C'est le phénomène d'anticipation.

D. Faux. Il peut y avoir une atteinte cognitive modérée dans la forme classique et sévère dans la forme congénitale.

Entraînement 22

Chapitre 23

QCM 1 : C, D, E

QCM 2 : A, B, D, E

QCM 3 : B, E

QCM 4 : B, D, E

QCM 5 : A, B, C, D

QCM 6 : B, D, E

QCM 7 : B, E

QCS 1 : E

Entraînement 23

Chapitre 25

QCM 1 : A, D, E

QCM 2 : B, C, D, E

QCM 3 : D, E

QCM 4 : A, C, D, E

QCM 5 : B, C, D, E

Entraînement 24

Chapitre 26

QCM 1 : A, C, D

QCM 2 : A, B

QCM 3 : A, B, C, D

QCM 4 : A, C

QCM 5 : D, E

QCM 6 : B, C, D

Entraînement 25

Chapitre 27

QCM 1 : A, B

QCM 2 : A, B, C, E

QCM 3 : A, B, E

QCM 4 : A, B, C, D, E

QCM 5 : A, B, D, E

QCM 6 : B, C

QCM 7 : C, D

QCM 8 : A, B, C

QCM 9 : D, E

QCS 1 : E

QCS 2 : A

QCS 3 : C

QCS 4 : C

QCS 5 : D

QCS 6 : D

QCS 7 : D

QCS 8 : A

QCS 9 : D

QCS 10 : E

QCS 11 : B

Entraînement 26

Chapitre 28

QCM 1 : A, B, C

QCS 1 : D

QCS 2 : D

QCS 3 : C

QCS 4 : B

QCS 5 : C

QCS 6 : B

QCS 7 : D

QCS 8 : A

Entraînement 27

Chapitre 29

QCM 1 : C, D, E

QCM 2 : A, B, C

QCS 1 : D

This page intentionally left blank

Postface

Les connaissances en génétique médicale présentées dans cet ouvrage de référence destiné à tous les étudiants en médecine constituent l'essentiel de ce qu'il faut connaître pour répondre aux questions des patients et des familles confrontés à une maladie héréditaire. Mais ces données scientifiques indispensables et régulièrement augmentées doivent aussi permettre de prendre conscience des caractéristiques qui font de la génétique une spécialité non seulement originale mais, surtout, profondément humaine.

En effet, la génétique concerne l'homme dans sa dimension historique et chacun connaît ses rapports ambigus avec le pouvoir politique. L'utilisation des prétendues théories génétiques de Lyssenko en Union soviétique, le recours aux lois nazies pour assurer la purification « raciale » sont des exemples qu'il faut garder en mémoire car « génétique », « gène », « génocide » et « eugénisme » appartiennent à la même famille. Certes, l'homme n'a pas attendu de connaître ses gènes pour réaliser des génocides et favoriser l'eugénisme. Mais la dimension historique de la génétique est capitale car, désormais, elle peut apporter un alibi scientifique pour justifier le choix de telle ou telle politique de sélection ou discrimination entre les personnes. Et cela, quelles qu'en soient les motivations profondes, idéologiques, économiques ou, même, « compassionnelles ». Étrangement, la génétique a souvent suscité le rejet de l'autre dans ses différences alors pourtant qu'elle démontre régulièrement que l'union des différences rend plus fort et plus résistant.

De plus, si la génétique intéresse l'homme dans sa dimension individuelle puisqu'elle peut l'atteindre dans sa personne, corps et esprit, elle l'implique aussi dans sa dimension collective. La survenue d'une maladie génétique concerne certes le patient d'abord, mais tout autant sa famille au travers des risques potentiels de partager ou de transmettre le gène pathologique incriminé. Colloque singulier et secret médical qui fondent notre médecine hippocratique peuvent (doivent ?) être contestés. Entre le respect de l'intimité du malade et la non-assistance à personne en danger, il s'agit probablement d'un des aspects les plus originaux,

mais aussi des plus délicats dans l'exercice du conseil génétique. Jusqu'à ce jour les discussions parlementaires n'ont pas trouvé le subtil équilibre dans le partage des droits de chacun à voir respecter la confidentialité de sa personne et des devoirs d'une solidarité responsable vis-à-vis des autres personnes concernées.

La génétique s'adresse, en outre, à l'homme dans sa dimension « matérielle », mais aussi dans sa dimension métaphysique. En effet, confronté à la mort, la seule réponse que l'homme ait trouvée est de transmettre la vie en concevant un enfant. C'est dire l'importance de la génétique lorsque des problèmes d'infertilité ou de possibles maladies héréditaires surviennent. La question de la descendance dépasse la seule maladie et la mort qu'elle entraîne pour atteindre une dimension transcendante qui engage l'espérance et l'avenir.

Enfin, la génétique s'affirme au moment où notre société s'interroge sur la perte de ses valeurs, de ses repères, voire de ses idéaux. Par les questions qu'elle soulève, elle conduit l'homme à s'engager dans un questionnement éthique vital. La vie est-elle un don ou un dû ? La qualité d'une personne dépend-elle de la qualité de ses gènes ? Peut-on affirmer qu'il est des vies qui ne valent pas d'être vécues ? Notre destin est-il écrit dans notre patrimoine génétique nous rendant prisonnier de notre ADN, seul décideur de nos vies ? En ce cas, quelle part de liberté nous reste-t-il pour choisir nos vies et donner un sens à notre existence ? Peut-on imaginer modifier notre patrimoine génétique et contribuer à l'apparition prochaine d'un « post-humanisme » comme l'annonçaient voici un siècle, les frères Julian et Aldous Huxley ? Toutes ces questions exigent une réflexion éthique devenue indispensable sauf à ce que l'homme devienne le jouet passif du seul progrès scientifique. On ne saurait trop mettre en garde contre la servitude d'une théologie de l'ADN qui seule donnerait un sens à la vie des hommes, et cela indépendamment des hommes eux-mêmes. Devant ces situations inédites, chacun est impliqué dans la recherche de son éthique de conviction, mais notre vie en collectivité nous oblige, aussi, à définir entre nous une

éthique de responsabilité indispensable pour assurer notre « vivre ensemble ». Responsable de soi, responsable des autres, voilà ce qui rend aussi la génétique profondément humaine. En ce sens, la génétique ne saurait se passer d'une référence constante à la qualité du lien social. C'est une des raisons qui me font plaider pour que des sciences humaines fortes puissent accompagner l'usage des technologies nouvelles. Car la connaissance en elle-même n'est pas un danger, elle fait même partie du projet de l'homme qui cherche toujours à mieux comprendre le monde qui l'entoure. En revanche, c'est son utilisation qui peut s'avérer dangereuse, d'où l'appel à la sagesse et à la réflexion. L'exemple de Francis Crick, codécouvreur de la double hélice d'ADN est édifiant. N'écrivait-il pas : « Aucun enfant ne devrait être reconnu humain avant d'avoir passé un certain nombre de tests portant sur sa dotation génétique. S'il ne réussit pas ces tests, il perd son droit à la vie. » Chacun peut louer son intelligence, tout comme chacun peut aussi douter de la justesse de sa pensée.

Avec l'informatique, les nanotechnologies et les sciences cognitives, la génétique et ses biotechnologies font partie des technologies convergentes engagées aux avant-postes des rêves les plus fous. Il est donc, plus que jamais, nécessaire de choisir ses repères pour garder le cap d'une médecine

au service des malades et de leurs familles. Il nous appartient d'œuvrer pour que les victoires de l'intelligence dans la recherche scientifique n'entraînent pas des défaites de la pensée au plan des choix de nos comportements collectifs. La question ultime étant celle-ci : « Qu'allons-nous faire de nous ? »

Notre avenir dépendra des choix que feront les générations qui vont se succéder. Il faut donc œuvrer pour qu'elles soient le mieux formées possible. Certes, sur le plan scientifique, mais aussi dans leur jugement sur l'homme, sa dignité et sa grandeur. De nouveaux progrès sont attendus chaque jour par les malades et leurs familles, les soignants et la communauté des hommes tout entière. Le but espéré étant de mieux connaître, mieux comprendre pour mieux soigner et guérir. La génétique, comme toute médecine, est faite pour soigner. Rien d'autre. Je sais que c'est possible et que notre espoir n'est pas vain. Mais à la condition de ne pas méconnaître cette permanence de l'homme qui doit forcer le respect en toutes circonstances.

Pr Jean-François Mattei,

Professeur émérite de pédiatrie et génétique médicale
Membre de l'Institut de France et de l'Académie nationale de médecine
Ancien ministre de la Santé, de la Famille et des Personnes handicapées

Index

5-méthylcytosine, 104

α -fœtoprotéine, 171

β -hCG, 171

A

ABL1, 90

Accompagnement psychologique, 207

Acétonitrile, 126

Acétyl coenzyme A (CoA), 212

Acide nucléique, 4

Acidose métabolique, 215

Acrocentriques, 62

ADN

– complémentaire (ADNc), 120, 122

– fœtal circulant, 171, 304

– libre (acellulaire) circulant (ADNct), 140

– méthylation, 222, 223

– mitochondrial (ADNmt), 212

– polymérase, 104, 119, 121

– satellite, 7

Agence de la biomédecine, 62, 202, 207

Agences régionales de santé (ARS), 62, 180

Agents cassants, 63

Alignement, 135, 268

Allele

– *by amplification created restriction site* (ACRS), 127

– *drop-out*, 176

Allèles, 42, 50, 107

Allele-specific oligoprobe (ASO), 127

Alu, 7, 32, 105

Amniocentèse, 170, 305

Amorces, 121

Amplicons, 121

Amplification-refractory mutation system (ARMS), 127

Amplifications, 95, 121

– géniques, 90

Amyotrophie bulbospinale, 239

Analyse

– chromosomique sur puce à ADN
(ACPA), 3, 76, 82, 129

– du polymorphisme de conformation
de l'ADN simple brin (SSCP), 126

Annotation, 137, 265

ANNOVAR, 268

Anomalie

– chromosomique, 62

– de nombre homogène, 65

– de structure, 63

– de structure équilibrée, 65

– de structure non équilibrée, 65

– du développement, 154

Anophtalmie, 155

Anticipation, 105, 234

Apnées du sommeil, 299, 300

Apoptose, 90

Appariement (mauvais), 127

Arachnodactylie, 157

ARN, 4

– de transfert (tRNA), 31

– interférence, 280

– messenger (ARNm), 121

– non codant, 30

– non codants (lncRNA), 32

Association française pour le dépistage et la prévention
des handicaps de l'enfant (AFDPHE), 180, 181

Associations, 149

Ataxie

– de Friedreich (FRDA), 238

– spinocérébelleuse, 234, 239

Atrophie optique de Leber, 215

Attestation de consultation, 62

Autodétermination, 303

Autonomie, 208

Autosomes, 42

Autosomique dominante, 42

Avantage sélectif, 54

Azoospermia factor (AZF), 21

B

Bacterial artificial chromosome (BAC), 129

Bandes

– C, 62

– R, 62

Base

– purique, 104

– pyrimidique, 104

Base calling, 135
Bases de données, 264
– ALFRED, 265
– DECIPHER, 84
– Ensembl, 265
– HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), 267
– Human Gene Mutation Database (HGMD), 267
– Locus Specific Databases (LSDB), 266
– National Center for Biotechnology Information (NCBI), 265
– Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), 113, 266
– University of California Santa Cruz (UCSC), 265
Binary alignment map (BAM), 268
Bioéthique, 198
Bioinformatique, 125, 264
Biopsie de trophoblaste, 170
Biotéine, 181
Bisulfite de sodium, 124
Blastomère, 175
Blépharophimosis, 155
Blocs génomiques conservés, 5
Bonnes pratiques, 199
Brachycéphalie, 155
Brachydactylie, 157
Brachymésophalangie, 157
Brachymétacarpie, 157
Brachymétatarsie, 157
Breakpoint cluster region (BCR), 90
Brin codant, 104
Bromure d'éthidium (BET), 120
Buphtalmie, 155

C

Camptodactylie, 157
Canal atrioventriculaire (CAV), 297
Cancer
– de l'endomètre, 258
– de l'ovaire, 252
– du sein, 252
– héréditaires, 248
– sporadiques, 248
Caractère pathogène (outils de prédiction), 268
Carcinomes, 97
Carte
– de restriction, 127
– génétique, 26
– physique, 27
Cartographie par homozygotie, 112
Caryotype, 95, 170
Cas par cas, 207
Cassures, 62
Cataractes congénitales, 299
CCDS (séquences codantes consensus), 265

Cellules
– somatiques, 104
– souches adultes, 277, 278, 279, 282
– souches embryonnaires, 277, 278, 279, 282
– souches pluripotentes induites, 277, 278
Centres
– de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM), 184
– pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN), 148, 168, 202
Centromères, 7
CGH-array, 35, 79, 93, 95, 96, 98, 129
Chaîne respiratoire, 212
Chimère, 65
ChIPSeq, 138
Chromatine, 5
Chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC), 126
Chromosome
– Philadelphie (Ph), 90
– X (inactivation), 16
– Y, 14
Chromosomes, 4
Chromothripsis, 71, 96
Clarté nucale, 168, 304
Classification de Denver, 62
Clinodactylie, 157, 297
Clivage, 127
Clonage positionnel, 310
Clusters, 107
Code génétique, 4
Codominants, 42
Codon STOP prématuré, 104
Complexe, 212
– I. Voir NADH ubiquinone oxydoréductase
– II. Voir Succinate ubiquinone oxydoréductase
– III. Voir Ubiquinol cytochrome *c* réductase
– IV. Voir Cytochrome *c* oxydase
– V. voir ATP synthétase
Conductrices, 46
Confidentialité, 200
Consanguinité, 45, 50
Conseil génétique, 148, 149, 182, 300
Consentement, 62, 199, 208
Contrôles de qualité, 200
Conversion génique, 106
Copy number polymorphism (CNP), 9
Copy number polymorphism (CNP), 83
Copy number variation (CNV), 9
– pathogène, 65
Copy number variation (CNV), 35, 79
– bénin, 83
– pathogène, 83
Corpuscule
– de Barr, 17
– XY, 15

Courbe de fusion, 127

CpG, 104

Crossing-over, 105

Curation, 264

Cytochrome c oxydase, 212

Cytogénétique

– moléculaire, 62

D

Data mining, 264

dbSNP, 265

dbVar, 265

Déacétylation des histones, 224

Débats citoyens, 207

Décalage du cadre de lecture, 104

Déficiência intellectuelle (DI), 2, 154, 297, 322

Délétion, 104, 128

– interstitielle, 67

Démence frontotemporale (DFT), 241

Dénaturation, 121

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Voir Formamide

Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), 126

Dépistage

– combiné, 304

– de la trisomie 21, 171

– néonatal (DNN), 180

– prénatal (DPN), 303

– prénatal non invasif (DPNI), 171

– séquentiel, 304

Déplétions, 215

Dérage, 104

Dérive génétique, 50

Désaminase, 104

Désamination, 104

Développement (retard), 2

Diagnostic

– direct, 127, 175

– indirect, 175

– préimplantatoire (DPI), 81, 148, 168, 202

– préimplantatoire associé au typage HLA (DPI-HLA), 175

– prénatal (DPN), 168, 202, 296

– prénatal non invasif (DPNI), 73, 140, 296, 305

– présymptomatique (DPS), 148, 201

– présymptomatique (DPS), 190

Didésoxynucléotides (ddNTP)

– fluorescents, 124

Dignité, 207

Discordances foetoplacentaires, 305

Discussion collégiale, 202, 207

Diseasecard, 266

Disomie uniparentale, 106, 222

Dnmt3A, 224

dNTP, 122, 124

Dolichocéphalie, 155

Dominant, 42

Drépanocytose, 180, 184

Droit de ne pas savoir, 200

Droits de la personne, 198

Duplications, 104

– segmentaires, 8, 36, 105

Dye terminators. Voir ddNTP fluorescents

Dysgénésie gonadique pure, 19

Dysgonosomies, 18

Dysmorphie, 154

Dysmorphologie, 154

Dystrophie musculaire de Duchenne, 282

E

Échographie prénatale, 168

Éducation précoce, 302

Effet

– de position, 31, 107

– dominant négatif, 111

– fondateur, 55, 112

Égalité d'accès aux soins, 200

Électrophorogramme, 124

Électrophorèse, 120

– sur gel en gradient dénaturant (DGGE), 126

Éléments

– non codants très conservés (HCNE), 31

– régulateurs, 30

– transposables (ET), 7

Empreinte

– génomique parentale, 222

– parentale, 106

Encadrement juridique, 198

Encyclopedia of DNA elements (ENCODE), 31

Enhancers, 31, 91, 107, 225

Enquête familiale, 154

Enzymes de restriction, 119

Enzymothérapies substitutives, 276

Épicanthus, 155

Épigénétique, 106

Épimutations, 226

Équipe pluridisciplinaire, 191

ExaC, 268

Examen dysmorphologique, 154

Excision, 104

Exome, 29, 134

Exonic splicing

– *enhancers* (ESE), 109

– *silencers* (ESS), 109

Exons, 29

Expansion

– de répétitions trinuéotidiques, 322

– de triplets, 105

Exploration du génome, 208

Expression (variabilité), 164

Expressivité, 44

Extraction des acides nucléiques, 118

F

FAIRE Seq, 138
Falciformation, 184
Femmes XY, 21
Fibres
– COX négatives, 215
– rouges déchiquetées, 215
Fibroblastes (culture), 63
Fluorescence in situ hybridization (FISH), 80, 91, 95, 128
– interphasique, 81, 176
Fluorescence resonance energy transfer (FRET), 122
Fluorimétrie, 181
Fluorochrome, 127
Fluorophores, 129
Fonction
– gain, 44, 111, 163, 234
– perte, 107, 163, 234
Formamide, 126
Forme congénitale, 240
Fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI), 325
Fragile X associated tremor ataxia syndrome (FXTAS), 325
Frameshift, 109
Frameshift. Voir Décalage du cadre de lecture
Fusion, 126, 127

G

Gels
– d'agarose, 120
– de polyacrylamide, 120
Gène, 4, 29
– APP, 300
– BRCA, 252, 253, 254
– BRCA2, 252
– CFTR, 310
– contigus, 106
– de fusion, 90
– FMR1, 322
– H19, 225, 228
– IGF2, 228
– *lgf2*, 225
– panel, 134
– rapporteurs, 107
– transfert, 274, 279, 280, 281, 282
Génome, 4, 33, 124, 135
– cartographie, 26
– haploïde, 62
Génotype, 42, 50
Gonosomes, 14, 42
Guide de bonnes pratiques, 208

H

Haplo-insuffisance, 44, 107
Hémizygotie, 106, 128

Hémoglobine anormale (HbS), 185
Hémopathies, 90
Hérédité
– autosomique récessive, 44
– liée au chromosome X, 45
– mendélienne, 42
Hétéroduplexes, 126
Hétérogénéité, 166
– allélique, 112, 113, 162, 163
– de locus, 162, 165
– génétique, 150, 162
– interlocus, 113
– phénotypique, 162, 165
Hétérozygote, 42
– composite, 45, 164
High resolution melting curve analysis (HRM), 127
Highly conserved non-coding elements (HCNE), 31. Voir
Éléments non codants très conservés (HCNE)
Histones, 4, 33
Hommes XX, 21
Homoduplexes, 126
Homologues, 105
Homozygote, 42
Hotspots, 104
Human Genome Project, 134
Human Genome Variation Society (HGVS), 266
Hybridation, 78, 121, 128, 129
– comparative génomique sur puce à ADN. Voir CGH-array
– génomique comparative, 35
– *in situ* fluorescente. Voir *Fluorescence in situ hybridization*
Hydroxylamine, 126
Hyperexpression, 90
Hyperlactémie, 215
Hyperlaxité, 297
Hyperphénylalaninémie, 181
Hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), 180, 183
Hypertélorisme, 155
Hypomorphe, 107, 111
Hypoprotidique, 182
Hypotélorisme, 155
Hypothyroïdie, 298
– congénitale (HC), 180, 182
Hypotonie, 297, 302

I

Immunoprécipitation de chromatine (ChIP), 138
Induced pluripotent stem cells (IPS), 277, 278
Information, 199, 208
– de la parentèle, 182, 201
Informativité, 34
Inhibiteurs de PARP, 254
Insertions, 71, 104
Instabilité
– C1-C2, 299
– chromosomique, 95

Insuffisance

- ovarienne primaire associée à l'X fragile (fragile X-associated primary ovarian insufficiency [FXPOI]), 236
- ovarienne primitive (IOP), 20

Interprétation, 125

Interruption médicale de grossesse (IMG), 168, 296, 305

Intronic splicing

- *enhancers* (ISE), 109
- *silencers* (ISS), 109

Introns, 30

Isochores, 6

Isochromosome, 68

- X, 19

K

Kinésithérapie, 301

L

Lecture (profondeur), 135

Leucémie

- aiguë mégacaryocytaire (LAM7), 298
- myéloïde chronique (LMC), 90

Leucémies

- aiguës lymphoblastiques (LAL), 92
- aiguës myéloïdes (LAM), 92

Leucémogénèse, 92

Liaison phosphodiester, 124

Ligase, 127, 128

Liquide amniotique, 63

Livedo, 297

Loci génomiques de référence (LGR), 265

Locus, 42

Locus control region (LCR), 107

Loi

- de bioéthique, 207
- de Hardy-Weinberg, 50
- du 11 février 2005, 302

Long interspersed nuclear elements (LINE), 7, 32, 105

Longs ARN non codants, 225

Low copy repeats (LCR). Voir Duplications segmentaires

Luciférase, 124

Lymphome de Burkitt, 91

M

Macrocéphalie, 155

Macrostomie, 156

Macrotye, 156

Maisons départementales

- de l'autonomie, 303
- des personnes handicapées (MDPH), 303

Makaton, 302

Maladie, 241

- à expansion de polyglutamine, 238
- coeliaque, 300
- d'Alzheimer, 300

- de Charcot. Voir Sclérose latérale amyotrophique (SLA)

- de Hirschsprung, 297, 299

- de Huntington (MH), 190, 234, 238

- de Scheie, 186

- de Steinert., 240. Voir Myotonie dystrophique de type 1 (DM1)

- résiduelle, 92

- neurodégénératives héréditaires, 190

Male-specific Y-chromosome (MSY), 15

Marqueur

- chromosomique surnuméraire, 173
- microsatellite polymorphe, 175
- sérique (MS), 304

Médecin prescripteur, 63

Médecine

- personnalisée, 98, 209
- prédictive, 190, 209

Médicament

- orphelin, 274
- réponse, 286

Mégaloconée, 155

Mésappariement, 105, 126

Métaboliseurs

- lents (ML), 286
- rapides (MR), 286
- ultrarapides (MUR), 286

Méthylation, 124

- profils, 223

Micro-ARN (miRNA), 30

Microcéphalie, 155

Microenvironnement, 95

Microphthalmie, 155

Microsatellites, 26, 35, 128

Microscopie en épifluorescence, 78

Microstomie, 156

Microtye, 156

Migration, 50, 126

Minisatellites, 35

Minor allele frequency (MAF), 113*Mismatch*. Voir Appariement (mauvais)

Mitelman database, 91

Mitochondrial encephalopathy lactic acidosis stroke-like episodes (MELAS), 215

Mitochondrie, 212

Modèles

- dominants, 163
- multifactoriels, 162, 166
- multigéniques, 166

Modifications épigénétiques, 223, 225

Mosaïcisme, 47, 63

Mosaïque

- chromosomique, 173
- germinale, 47
- somatique, 47, 107

Mucoviscidose, 183
Multifluorescence, 77, 78
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), 63, 128
Mutations, 33, 126
– « privées », 112
– d'épissage, 109
– d'un gène MMR, 260
– *de novo*, 106, 113
– dominantes négatives, 44
– dynamiques, 105, 234
– en *cis*, 107
– faux sens, 110
– germinales, 104
– hétéroplasmiques, 215
– instables, 105
– nomenclature, 268
– non-sens, 109
– par expansion instable, 234
– passagers (passagères), 92
– récessives, 111
Myélodysplasies, 93
Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers (MERRF), 215
Myotonie
– dystrophique, 234
– dystrophique de type 1 (DM1), 234, 240

N

NADH ubiquinone oxydoréductase, 212
Néomutations. Voir Mutations *de novo*,
Next-generation sequencing (NGS), 4
Next-generation sequencing (NGS), 28, 118, 124, 134, 208, 267
Nomenclature ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), 62
Non-allelic homologous recombination (NAHR), 105
Non-homologous end-joining (NHEJ), 67
Non-recombining Y chromosome (NRY), 15
Nonsense-mediated decay (NMD), 110
Northern blot, 121
Nucléotides, 212
Nuque, 297
– épaisse, 168

O

Obésité, 298
Oligodactylie, 157
Oligonucleotide ligation assay (OLA), 127
Oligonucléotides, 121, 129
Oligosonde, 127
Oncogenèse, 95
Orthophonie, 301
Otites, 299

P

Paralogues, 105
Particulière gravité, 207

PCR
– « multiplexe », 128
– en temps réel, 122, 128
– quantitative, 122, 128
Pectus
– *carinatum*, 157
– *excavatum*, 157
Peinture chromosomique, 77
Pénétrance, 44
Petits ARN nucléaires, 30
Pharmacogénétique, 286
Phénotype, 42
Phénylcétonurie (PCU), 180, 181
Phosphorylation oxydative (OXPHOS), 212
Pléiotropie. Voir Hétérogénéité phénotypique
Pli palmaire transverse unique, 297
Point
– chaud de mutations, 112
– de cassure, 63, 67
Polydactylie, 157
Polymerase chain reaction (PCR), 26, 118, 121
Polymérase, 119
Polymérisation, 122
Polymorphes, 128
Polymorphismes, 26, 42, 113, 164, 286
– de l'ADN, 33
– de longueur de fragment
 de restriction (RFLP), 35
Population, 180
Porteur, 310
Postzygotique, 107
Prédiction *in silico*, 113
Prédisposition, 94
Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), 171
Prélèvement, 62
Prémutation (PM), 322, 323
Pré-screening, 126
Prévention, 148, 209
Primers. Voir Amorces
Prognathie, 155
Projet
– 1000 génomes, 28, 268
– de vie, 303
– HapMap, 28
Propriété toxique (gain), 234, 242
Proptosis, 155
Protéine de fusion, 95
Pseudogène, 106
Psychologue, 149
Pterygium colli, 157
Ptosis, 155
Pyrogramme, 124
Pyrophosphate (PPi), 124
Pyroséquençage, 124

Q

Q-PCR. Voir PCR en temps réel

Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF), 128

R

Ragged-red fibers. Voir Fibres rouges déchiétées

Rapport

- des corps cétoniques 3-hydroxybutyrate (3-OHB)/acétoacétate (AcAc), 215
- lactate(L)/pyruvate (P), 215

Ratios alléliques, 127

Real time sequencing. Voir PCR en temps réel

Réarrangement, 66

- chromosomique, 106
- déséquilibré, 67
- équilibré, 67

Récessif, 42

Recombinaison

- homologue, 105
- intrachromatidienne, 105
- non homologue, 105

Récurrence, 148

Reflux gastro-œsophagien (RGO), 299

Région 5'UTR, 105

Régions

- pseudo-autosomales, 15
- subtelomériques, 3

Relation avec le patient, 208

Remaniements, 104

- chromosomiques acquis, 64
- chromosomiques constitutionnels, 64
- chromosomiques en apparence équilibré, 173
- récurrents, 67

Répétition en tandem, 104, 128

Réplication (profils), 224

Représentants légaux, 199

Restriction fragment length polymorphism (RFLP), 26, 127

Rétrognathie, 155

Rétrotransposons, 7, 105

Rétrovirus endogènes, 7

Reverse transcription PCR (RT-PCR), 122

Risque, 148

RNAseq, 138

S

Sang fœtal (ponction), 170

Sanger, Frederick, 124

Saut d'exon, 276, 281, 282

Sclérose latérale amyotrophique (SLA), 234, 241

Secret professionnel, 200

Segments synthéniques, 5

Ségrégation, 64

Sélection, 50

Semi-dominants, 42

Séquençage, 28, 118, 124, 125, 126, 134

- à haut débit, 125
- de nouvelle génération. Voir Next-generation sequencing (NGS)
- du génome, 28
- par synthèse, 124
- selon Sanger, 134

Sequence

- capture, 135
- consensus, 109
- couverture, 135
- lectures, 135
- reads. Voir Lectures de séquence
- répétées, 6
- répétées dispersées, 105

Sérine kinase, 90

Sequence alignment map (SAM), 268

Short interspersed

- nuclear elements (SINE), 7

Short interspersed nuclear

- elements (SINE), 32, 105

Silencers, 107, 225

Single nucleotide polymorphisms (SNP), 28, 80

single-strand conformation polymorphism (SSCP), 126

Sites

- cryptiques d'épissage, 109
- de branchement, 109
- de polyadénylation, 109
- de restriction, 127
- fragiles communs, 62
- fragiles rares, 62

Slippage. Voir Dérapage

SNP-array, 93

snRNA. Voir Petits ARN nucléaires

Sondes, 76, 120, 128

Southern blot, 120

Spectre autistique (troubles), 324

Statut d'oxydoréduction, 215

Stigmatisation, 210

Stratégie « trio », 139

Substitution, 104

Succinate ubiquinone oxydoréductase, 212

Suppresseur de tumeur, 95

Surdité, 180, 181, 185, 299

Surexpression, 111

SYBR® Green, 122

Syndactylie, 157

Syndrome

- d'Allan-Herndon-Dudley, 182
- d'Angelman, 226
- de Bonnevie-Ullrich, 19
- de Kearns-Sayre, 216
- de Klinefelter, 19
- de l'X fragile (FXS), 63, 236
- de Leigh, 215
- de Lynch, 255, 256

- de Pearson, 216
 - de Peutz-Jeghers, 255
 - de Prader-Willi, 226
 - de retard mental avec X fragile, 234
 - de Silver-Russell, 227
 - de Turner, 18
 - de West, 299
 - de Wiedemann-Beckwith, 227
 - double Y, 20
 - dysmorphiques, 154
 - malformatifs, 154
 - microdélétionnels, 80
 - NARP (*neuropathy, ataxia, retinis pigmentosa*), 215
 - tremblement-ataxie associé à l'X fragile (*fragile X associated tremor ataxia syndrome [FXTAS]*), 234, 236
- Synophrys, 156
- Synthénie, 5
- Système MMR (pour *mismatch repair system*), 256

T

- Taches de Brushfield, 297
- Taq polymérase, 120, 121
- Technique « 5c », 138
- Techniques, 62, 215
- de bandes, 62
 - polarographiques, 215
 - spectrophotométriques, 215
- Télomères, 7
- Territoire chromosomique, 33
- Test
- de dépistage, 184
 - de la sueur, 184
 - génétique, 198
 - présymptomatique, 241
- Tétroxyde d'osmium, 127
- Théorème de Bayes, 150
- Thérapie
- cellulaire, 274, 277, 278, 282
 - génique, 274, 276, 279, 280, 281, 282
- Thérapies pharmacologiques « mutations spécifiques », 310
- Thermocycler, 122
- Threshold cycle (Ct), 122, 128
- Transcriptome, 138
- Transcrits antisens, 225, 230
- Trans-épissage, 281
- Transgène, 280
- Transitions, 104

- Translecture, 275, 276, 284
- Translocations
- X-Y, 21
- Transmission, 105, 148
- Transposons, 7
- Transversions, 104
- Tri embryonnaire, 206
- Trinucléotides CCG, 322
- Trisomie, 65
- 21 (T21), 64, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305
 - X, 20
- Trophocentèse, 170
- Trypsine, 64
- immunoréactive (TIR), 184
- Tumeur
- colorectale, 257
 - de Wilms, 226
- Tyrosine kinase, 90

U

- Ubiquinol cytochrome c réductase, 212
- Urée, 126
- Utilité clinique, 200

V

- Variant
- *call format* (VCF), 268
 - *calling*, 137, 268
 - *of uncertain significance* (VOUS), 83
 - rares, 164
- Variants, 33, 62, 164
- Variants de nombre de copies. Voir *Copy number variation* (CNV)
- Variations
- isosémantiques, 111
 - silencieuses, 111
 - synonymes, 111
- Vecteurs, 279, 280
- Villosité chorale, 63

W

- Whole-exome sequencing [WES], 4

X

- X
- biais d'inactivation, 18
 - disomie fonctionnelle, 18
- Xist (*X-inactive-specific-transcript*), 17

474521 – (I) – 2,5 – CS115

Elsevier Masson SAS
62, rue Camille Desmoulins
92442 Issy-les-Moulineaux Cedex
Dépôt légal : février 2016

Composition : SPI

Imprimé en Italie par Printer Trento

This page intentionally left blank