

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale (CNEPGM)

*Collège National des Enseignants et Praticiens
de Génétique Médicale*

**Enseignement
Génétique médicale**

POLYCOPIE

Sommaire

Génétique formelle et clinique

- 1 Génétique et santé publique (*à venir*)
- 2 Génétique des populations
- 3 Méthodes en génétique : caractères simples, hérédité complexe, calcul de risque
- 4 Hérédité mendélienne
- 5 Maladies complexes: malformations, diabète, cancers...
- 6 Empreinte Génomique (*à venir*)
- 7 Disomies uniparentales (*à venir*)
- 8 Déficience intellectuelle (*à venir*)
- 9 Les Cytopathies mitochondriales
- 10 Prédispositions génétiques au cancer
- 11 Le conseil génétique (*à venir*)
- 12 DPI (*à venir*)
- 13 Le dépistage néonatal
- 14 Les tests génétiques présymptomatiques et la médecine prédictive
- 15 Perspectives thérapeutiques
- 16 Considérations éthiques, juridiques et psychologiques

Génétique chromosomique

- 17 Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques
- 18 Caryotype humain : Techniques - Indications
- 19 La cytogénétique moléculaire
- 20 Aspects cliniques des anomalies des autosomes hors trisomie 21
- 21 Dysgonosomies X, XXY, XXX, XYY
- 22 Diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques (et moléculaires)
- 23 Anomalies cytogénétiques des hémopathies malignes (*à venir*)
- 24 Altérations chromosomiques dans les tumeurs solides
- 25 Microremaniements chromosomiques (*à venir*)

Génétique moléculaire

- 26 Bases moléculaires des mutations et Bases moléculaires du mode de transmission des maladies génétiques
- 27 Applications de la génétique moléculaire au diagnostic (*à venir*)
- 28 Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique

Programme ECN

- 29 Trisomie 21
- 30 Syndrome de l'X fragile
- 31 Mucoviscidose

Génétique des populations

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Nicole Philip

Département de génétique médicale, Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	La loi de Hardy-Weinberg.....	3
I.1	Application de la loi de Hardy-Weinberg à l'estimation des fréquences des gènes autosomiques.....	5
I.2	Pour les maladies liées au chromosome X.....	5
I.3	Pour vérifier si la loi de Hardy -Weinberg s'applique à une population donnée pour un gène donné.....	6
I.3.1	On calcule les fréquences alléliques à partir des fréquences des génotypes	6
I.3.2	On compare les nombres attendus aux nombres observés	7
II	Facteurs influençant les fréquences géniques.....	9
II.1	Mutations.....	9
II.2	Sélection	9
II.3	Dérive génétique.....	10
III	Causes du maintien des maladies génétiques malgré la sélection dans les grandes populations.....	11
III.1	L'équilibre mutation-sélection.....	11
III.2	L'avantage sélectif des hétérozygotes.....	13
IV	Fréquence élevée de certaines maladies très rares dans de petites populations : l'effet fondateur.....	14
V	Consanguinité.....	14
V.1	Calcul du coefficient.....	14
V.2	Consanguinité et maladie récessive autosomique.....	15
V.3	Les conséquences de la consanguinité à l'échelle d'une population.....	16
VI	Annexes.....	17

La génétique des populations a pour objectif l'étude de la fréquence des gènes et des génotypes, 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 gènes et des génotypes. La consanguinité (union entre sujets apparentés) peut modifier la fréquence des génotypes sans influencer la fréquence des gènes.

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 la fréquence des gènes à partir des génotypes

Pour parler de fréquences géniques (ou plutôt alléliques), on se réfère à la notion de « pool » de gènes d'une population. Pour un gène autosomique, dans une population de N individus, il y a 2 N 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 gènes à partir des génotypes n'est possible que si tous les génotypes sont identifiables : les deux allèles sont codominants.

La meilleure estimation des la fréquence de ces allèles est :

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

$$q = f(BB) + 1/2 f(AB)$$

I 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).

La loi de Hardy-Weinberg

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

Fréquence du génotype **AA** : **p²**

Fréquence du génotype **aa** : **q²**

Fréquence du génotype **Aa** : **2pq**

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

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

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 ³ q	p ² q ²
Aa	2p ³ q	4p ² q ²	2pq ³
aa	p ² q ²	2pq ³	q ⁴

Fréquence des mariages aa x Aa = 2pq³ + 2pq³ = 4 pq³

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

I.1 APPLICATION DE LA LOI DE HARDY-WEINBERG À L'ESTIMATION DES FRÉQUENCES DES GÈNES AUTOSOMIQUES

Si les hétérozygote ne sont pas reconnaissables (dominance complète d'un allèle), dans l'hypothèse où les génotypes sont en équilibre, les fréquences géniques 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 homozygote 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 correspond à q^2 .

On peut donc en déduire $q = \sqrt{q^2}$; $p = 1 - q$

La fréquence des hétérozygotes Aa correspond à $2pq$ et peut être calculée

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

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

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

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

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

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

I.2 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

Maladie récessive liée au chromosome X					
	Garçon		Filles		
Phénotype	Sain	Malade	Sain	Saine	(Malade)
Génotype	A	A (I)	AA	Aa (H)	aa
Fréquence	p	q	p ²	2pq	q ²

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

La fréquence des filles hétérozygotes, H est donc égale à :

$$2 \times q \times (1 - q)$$

Si q est très petit : H = 2I (il y a deux fois plus de femmes hétérozygotes que de garçon atteints).

I.3 POUR VÉRIFIER SI LA LOI DE HARDY -WEINBERG S'APPLIQUE À UNE POPULATION DONNÉE POUR UN GÈNE DONNÉ

I.3.1 On calcule les fréquences alléliques à partir des fréquences des génotypes

Population N ---> nombre d'allèles = 2N

Nombre d'individus AA = x

Nombre d'individus BB = y

Nombre d'individus AB = z

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

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

I.3.2 On compare les nombres attendus aux nombres observés

Nombres attendus = AA: p² x N ,

AB: q² x N,

BB: 2pq x N

Nombres observés= fréquence des phénotypes

On fait un test de X²

EXEMPLE

Genotypes associated with myocardial infarction risk are more common in African Americans than in European Americans.

Lanfear DE, et al J Am Coll Cardiol. 2004 Jul 7;44(1):165-7

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)

Fréquence des différents génotypes

Polymorphisme	GJA-4 (C10009T)			MMP-3 (-1171delA)			PAI-1 -668delG
	C/C	C/T	T/T	-/-	-/A	A/A	-/-
AA nombre	24	52	19	2	19	74	7
AA %	(25.3)	(54.9)	(19.8)	(2.2)	(19.8)	(78)	(7.6)
EA nombre	46	42	7	30	42	23	37
EA %	(48.4)	(44.1)	(7.5)	(32.3)	(44.1)	(23.6)	(38.7)

Pour le polymorphisme GJA-4 (C10009T)

Dans la population AA : nombres observés

$$\text{Fréquence de l'allèle C : } \frac{(24 \times 2) + 52}{95 \times 2} = \frac{100}{190} = 0,526$$

$$\text{Fréquence de l'allèle T : } \frac{(19 \times 2) + 52}{95 \times 2} = \frac{90}{190} = 0,474$$

Nombres attendus :

- génotype C/C : $(0,526) \times 2 \times 95 = 26,2$
- génotype C/T : $2 \times 0,526 \times 0,474 \times 95 = 47,3$
- génotype T/T : $(0,474) \times 2 \times 95 = 21,3$

$$x^2 : \sum(o-e)^2 = (24-26.2)^2 + (52-47.3)^2 + (19-21.3)^2 = 0.185 + 0.47 + 0.25 = 0.9$$

-----	-----	-----	-----
e	26.2	47.3	21.3

(p entre 0.3 et 0.5 : non significatif)

II FACTEURS INFLUENÇANT LES FRÉQUENCES GÉNIQUES

Déviations à l'équilibre de Hardy-Weinberg

II.1 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



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**.

II.2 SÉLECTION

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

A 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 la **f** du génotype optimum. **s = 1 - f**

II.3 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:

- si un gène 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 ce gène, le gène en question va complètement disparaître de la population (éteint : fréquence = 0) et son 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 d'un échantillon de $2N_e$ gamètes.

Soient p et q la proportion des 2 allèles à la première génération.

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

$$pq$$

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

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

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

A la génération suivante, p sera compris entre 0,40 et 0,60 (+/- 2 écart-types) avec une probabilité de 95%.

A la génération suivante, si $N_e = 50$ et $p = 0,4$

$$\sigma^2 = \frac{0,4 \times 0,6}{100} = \frac{0,24}{100} = 0,0024 \rightarrow \sigma \sim 0,05$$

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:

$$1$$

-soit de disparaître: probabilité = $1 - \frac{1}{2Ne}$

$$2Ne$$

$$1$$

-soit d'éliminer les autres: probabilité = $\frac{1}{2Ne}$

$$2Ne$$

Dans une population de 500 individus, un nouvel allèle a 1 chance sur 1000 d'éliminer les autres et 999 chances sur 1000 d'être éliminé.

La durée moyenne est de :

$2 \log(2N)$ génération pour la disparition

$4N$ générations pour la fixation.

III 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 ne sont pas transmis à la génération suivante et disparaissent donc du « pool » d'allèles. Malgré ceci, les maladies génétiques se maintiennent à une fréquence stable dans la population. Deux phénomènes peuvent expliquer ceci :

III.1 L'ÉQUILIBRE MUTATION-SÉLECTION

A chaque génération, les mutations survenues « de novo » vont compenser la perte des allèles liés à la sélection.

a) Dans une maladie dominante génétiquement létale (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 tanathophore, les encéphalopathies liées à des mutations de gènes comme *MEF2C*, *EHMT1*....)

b) Dans 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 80% des enfants achondroplasies naissent de parents normaux.

c) Dans une maladie récessive liée au chromosome X

Dans 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 un tiers du « pool » d'allèles mutés 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 homes 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 $f = 0$

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

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

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

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 mutation *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 $f = 0,7$

$$H = 2\mu + H/2 + 1(0,7)$$

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

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

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

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

d) Dans 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 mutation *de novo* est très faible (mais non nul)

Age 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 tanathophore, 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) 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 (Goriely). 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...), mutations retrouvées dans certains cancers.

III.2 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 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 de mortalité majeur 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 cholera et autres maladies infectieuses intestinales dont les épidémies ont décimé les populations jusqu'au moyen-âge. Ceci est souvent appelé "**overdominance**". (Permet de compenser la perte des gènes liée à l'infertilité des homozygotes)

IV 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'individu, 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.

V 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 proviennent de la réplication 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.

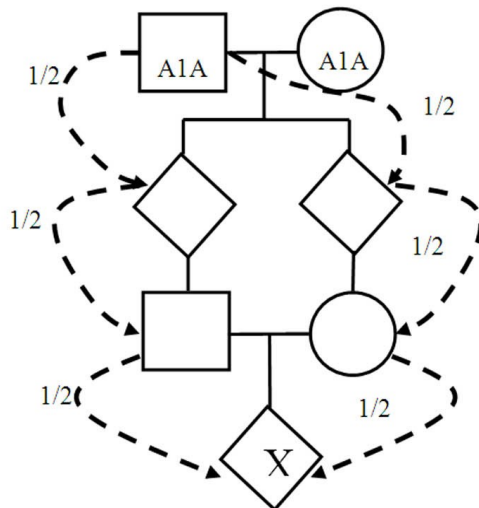
V.1 CALCUL DU COEFFICIENT

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 réplication d'un des ces 4 allèles ancestraux

Calcul du coefficient



L'individu X a :

Une probabilité de $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{8}$
d'avoir reçu l'allèle A1 au locus
paternel

Une probabilité de $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{8}$
d'avoir reçu l'allèle A1 au locus
maternel

Une probabilité de $\frac{1}{8} \times \frac{1}{8} = \frac{1}{64}$ d'être
homozygote pour cet allèle A1

Selon le même raisonnement, il a une
probabilité de $\frac{1}{64}$ 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 $\frac{1}{64} \times 4$
 $= \frac{1}{16}$

$\frac{1}{16}$ = coefficient de consanguinité d'un individu issu de parents cousins germains

Pour chaque allèle, X a $(\frac{1}{2})^{m+p+2}$ chances d'être homozygote,

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

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

Pour chaque ancêtre, X a $\frac{1}{2} (m+p+1)$ ($= 2 \times \frac{1}{2} (m+p+2)$) chances d'être homozygote.

Coefficient de consanguinité F **$F = \sum \frac{1}{2} (m+p+1)$**

\sum = somme (on calcule $\frac{1}{2} (m+p+1)$ pour chaque ancêtre)

V.2 CONSANGUINITÉ ET MALADIE RÉCESSIVE AUTOSOMIQUE

A 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

$$Fq + (1-F)q^2$$

$$\text{soit} = q^2 - Fq^2 + Fq$$

$$\text{soit} = q^2 + Fq(1-q)$$

$$\text{soit} = \mathbf{q^2 + Fq}$$
 (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 égal à **$q^2 + Fq$**

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 : $q^2 = 1/10000$

$$\begin{aligned} R \text{ (risque lié à la consanguinité)} &= 1 / 10000 + (1/16 \times 1/100) \\ &= 1 / 10000 + 1/1600 \\ &= \mathbf{1/1600} \end{aligned}$$

$$RR = \text{risque lié à la consanguinité} / \text{risque de la population générale}$$
$$1/1600 / 1/10\ 000 = 6$$

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 ($q^2 = 1/3000$) : $RR = 3.5$

Galactosémie ($q^2 = 1/40000$) : $RR = 12$

Ataxie télangiectasie ($q^2 = 1/100000$) : $RR = 20$

V.3 LES 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 A_1 et A_2 , de fréquences respectives p et q chez les parents.

Soit F le coefficient moyen de parenté à la génération des parents.

A 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

$$\text{Ex: } f(A1) = (p^2 + Fp(1-p)) + (1/2)(2pq - 2Fpq) = p^2 + Fpq + pq - Fpq = p^2 + pq = p(p+q) = p$$

Donc: la consanguinité ne s'accompagne pas de détérioration du stock génique dans une grande population, mais d'une augmentation de la morbidité pour les maladies autosomiques récessives.

VI ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- Alfonso-Sánchez MA, Pérez-Miranda AM, García-Obregón S, Peña JA. : An evolutionary approach to the high frequency of the Delta F508 CFTR mutation in European populations. Med Hypotheses. 2010 Jun;74(6):989-92.
- Goriely A, McVean GA, Røjmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AO. : Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. Science. 2003 Aug 1;301(5633):643-6.
- Risch N, Tang H, Katzenstein H, Ekstein J. : Geographic distribution of disease mutations in the Ashkenazi Jewish population supports genetic drift over selection. Am J Hum Genet. 2003 Apr;72(4):812-22
- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N et al. : Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. Nature. 1995 Jul 20;376(6537):246-9
- Zlotogora J. : High frequencies of human genetic diseases: founder effect with genetic drift or selection? Am J Med Genet. 1994 Jan 1;49(1):10-3

Évaluation du risque en conseil généétique

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Nicole Philip

Département de génétique médicale, Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Le risque a priori dans les maladies monogéniques.....	3
I.1	Maladies autosomiques dominantes.....	3
I.2	Maladies autosomiques récessives.....	3
I.3	Maladies liées au chromosome X.....	5
II	Ajustement du calcul de risque : probabilités bayésiennes	6
II.1	On construit 4 niveaux de probabilités.....	6
II.2	Premier exemple : estimation du risque d'hétérozygotie pour une maladie lié à l'X.....	7
II.3	Deuxième exemple : Analyse bayésienne utilisant les résultats des analyses moléculaires	8

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 des tests génétiques.

I LE RISQUE A PRIORI DANS LES MALADIES MONOGÉNIQUES

I.1 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.

I.2 MALADIES AUTOSOMIQUES RÉCESSIVES

1) 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 : $1/2 \times 1/2 = 1/4$

2) La probabilité qu'un individu soit hétérozygote pour une mutation dans un gène donné dépend de l'existence ou non d'un antécédent familial :

a) 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.

Figure 1 : Maladies autosomiques récessives

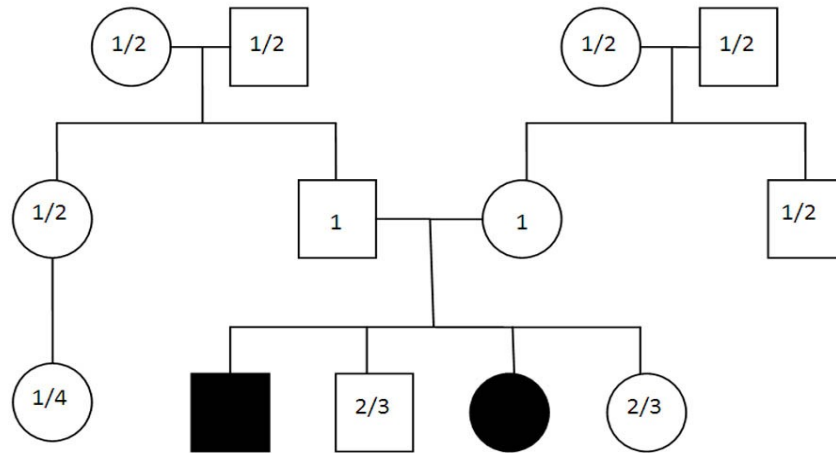


Figure 2 : Maladies autosomiques récessives

<p>Pourquoi 2/3 pour les frères et soeurs ?</p> <p>2/3 des enfants sains sont hétérozygotes</p>	<p>Pourquoi 1/2 pour les oncles et tantes ?</p> <p>Chacun des deux grands-parents a 1/2 risque d'être hétérozygote.</p> <p>Les oncles et tantes qui sont phénotypiquement sains donc non homozygotes ont donc un risque de :</p> <p>1/2 X 1/2 de recevoir la mutation de leur mère : 1/4</p> <p>1/2 X 1/2 de recevoir la mutation de leur père : 1/4</p> <p>On suppose qu'ils sont sains. Leur risque d'être hétérozygote est donc de</p> <p>1/4 + 1/4 = 1/2</p> <p>(En effet, ils ont pu recevoir la mutation de leur père OU de leur mère, donc on additionne (+). Si on multiplie, on calcule leur risque de recevoir la mutation de leur père Et de leur mère, donc leur risque d'être homozygote....)</p>
---	--

b) 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 calculé à partir de la fréquence de la maladie en utilisant la loi de Hardy-Weinberg ($2pq \sim 2\sqrt{q^2}$).

Figure 3 : Loi de Hardy-Weinberg

Exemple :
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 25000 dans la population générale et dont est atteint l'individu C, frère de monsieur B ?

Risque que monsieur B soit hétérozygote : $\frac{2}{3}$ puisque c'est le frère d'un individu malade homozygote.

Risque que monsieur B transmette l'allèle muté s'il est hétérozygote : $\frac{1}{2}$

Risque que madame A soit hétérozygote :

$$2pq \sim 2\sqrt{q} = 2\sqrt{\frac{1}{2500}} = 2 \times \frac{1}{50} = \frac{1}{25}$$

Risque que madame A transmette l'allèle muté s'il est hétérozygote : $\frac{1}{2}$

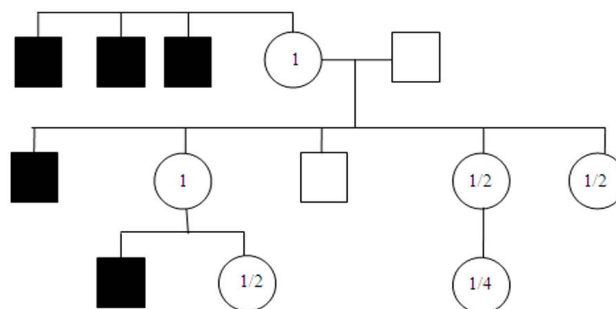
Risque que l'enfant soit atteint = $\frac{2}{3} \times \frac{1}{25} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{2}{3} \times \frac{1}{25} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{150}$

I.3 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 $\frac{1}{2}$ risque d'être elles-mêmes hétérozygotes. Le risque d'une fille est égal à la moitié du risque de sa mère.

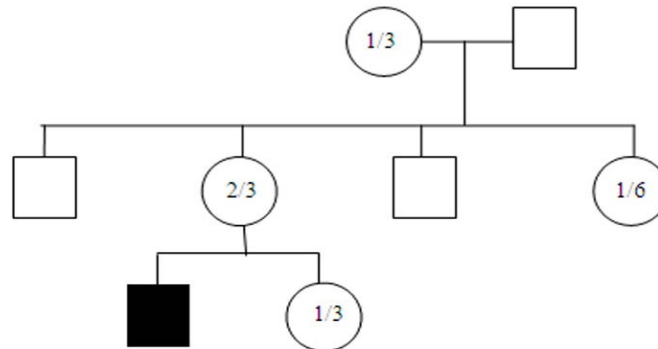
Figure 4 : Maladies liées au chromosome X



En l'absence d'histoire familiale, il n'est pas possible d'exclure une mutation *de novo*. Pour une maladie génétiquement létale au sens que les individus atteints n'ont pas de descendance (comme par exemple la dystrophie musculaire de Duchenne), la probabilité

pour la mère d'un cas sporadique d'être hétérozygote est de $2/3$ (puisque un tiers des cas sont liés à des mutations *de novo*). (cf cours sur la génétique des populations).

Figure 5 : Maladies liées au chromosome x



II AJUSTEMENT DU CALCUL DE RISQUE : PROBABILITÉS BAYESIENNES

Décrit au 18^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'exams biologiques, notamment de génétique moléculaire.

Il est largement utilisé pour calculer le risque génétique

II.1 ON CONSTRUIT 4 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**

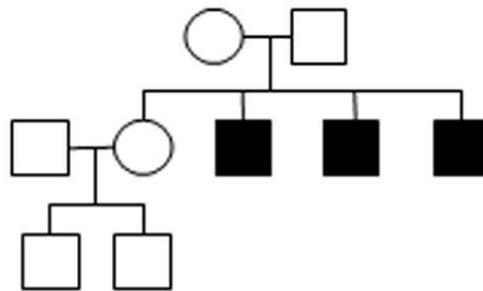
Probabilité de A et B ($P(A \times B \text{ si } A)$) ou probabilité de \bar{A} et B ($P(\bar{A} \times B \text{ si } \bar{A})$)

- **Probabilité a posteriori de chacune des hypothèses de départ en tenant compte de l'évènement**

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 : $P(A \text{ si } B) = \frac{P(B \text{ si } A)}{P(B \text{ si } A) + P(B \text{ si } \bar{A})}$

II.2 PREMIER EXEMPLE : ESTIMATION DU RISQUE D'HÉTÉROZYGOTIE POUR UNE MALADIE LIÉ À L'X

Figure 6 : Risque d'hétérozygotie

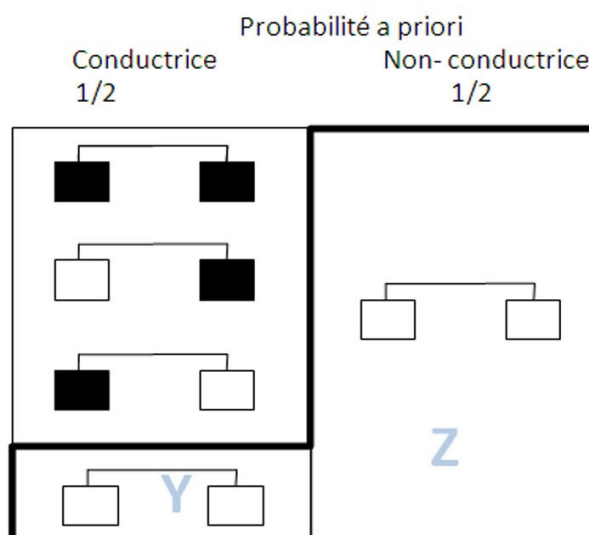


Madame X a trois frères atteints d'une dystrophie musculaire de Duchenne, maladie récessive liée au chromosome X. Les antécédents familiaux démontrent que sa mère est obligatoirement hétérozygote (conductrice). Madame A a donc une probabilité a priori de 50% (1/2) de porter elle-même la mutation à l'état 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 « évènement » qui peut modifier la détermination du risque.

Figure 7 : Risque d'hétérozygotie



Tableau

Hypothèse	Conductrice	Non conductrice
Probabilité à priori	1/2	1/2
Probabilité conditionnelle (avoir 2 garçons sains)	$1/2 \times 1/2 = 1/4$	1
Probabilité jointe	1/8	1/2
Probabilité à postérieur	$(1/8) / (1/8 + 1/2) = 1/5$	$(1/2) / (1/2 + 1/8) = 4/5$

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) = $P_A \times P_{B \text{ si } A} = 1/2 \times 1/4 = 1/8$

Probabilité a posteriori :

Probabilité d'être conductrice si elle a deux enfants sains :
$$\frac{Y}{Y + Z} = \frac{1/8}{1/8 + 1/2} = 1/5$$

II.3 DEUXIÈME EXEMPLE : ANALYSE BAYESIENNE 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 ?

Figure 8 : Analyse bayésienne

Probabilité a priori	
Hétérozygote 1/50	Non- hétérozygote 49/50
Probabilité que la mutation soit identifiée s'il est hétérozygote : 9/10	Probabilité qu'aucune mutation ne soit identifiée s'il n'est pas hétérozygote : 1 Z
Probabilité qu'aucune mutation ne soit identifiée s'il est hétérozygote : 1/10	

Probabilités a priori :

D'être hétérozygote : 1/50; (PA) : 1/50 De ne pas être hétérozygote : 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 X 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 X 1 =

Probabilité a posteriori :

Probabilité d'être conductrice si elle a deux enfants sains :
$$\frac{Y}{Y + Z} = \frac{1/500}{1/500 + 49/50} = 1/491$$

BIBLIOGRAPHIE

- Ogino S et Wilson RB : Bayesian analysis and risk assessment in genetic counseling and testing. J Mol Diagn. 2004; 6:1-9.

Hérédité monogénique

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Dominique Bonneau

Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Généralités.....	4
I.1	Définition.....	4
I.2	Notions fondamentales.....	4
I.3	La dominance et la récessivité des allèles.....	5
I.4	L'arbre généalogique.....	5
II	Hérédité autosomique dominante.....	6
II.1	Définition.....	6
II.2	Caractéristiques généalogiques des maladies AD.....	7
II.3	Exemples de maladie AD.....	8
II.4	Particularités de l'hérédité AD.....	8
II.4.1	Pénétrance incomplète.....	8
II.4.2	Expressivité variable.....	8
II.4.3	Néomutations ou mutations de novo.....	9
II.4.4	Mosaïques germinales.....	9
II.5	Mécanismes de la dominance	9
III	Hérédité autosomique récessive.....	10
III.1	Définition.....	10
III.2	Caractéristiques généalogiques des maladies AR.....	10
III.3	Risque de récurrence.....	10
III.4	Exemples de maladie AR.....	11
III.5	Particularités de l'hérédité AR.....	11
IV	Hérédité liée au chromosome X.....	12
IV.1	Hérédité récessive liée à l'X (RLX).....	12
IV.1.1	Définition.....	12

IV.1.2	Caractéristiques généalogiques des maladies RLX	12
IV.1.3	Risques de récurrence (figure 4).....	12
IV.1.4	Exemples de maladie RLX.....	13
IV.1.5	Particularités de l'hérédité RLX.....	13
IV.2	Hérédité dominante liée à l'X (DLX).....	14
IV.2.1	Définition.....	14
IV.2.2	Caractéristiques généalogiques des maladies DLX et risque de récurrence (figure 5).....	14
IV.2.3	Exemples de maladies DLX.....	15

I GÉNÉRALITÉS

I.1 DÉFINITION

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

I.2 NOTIONS FONDAMENTALES

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

- Les **autosomes gonosomes** ont 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**.
Un allèle porteur d'une mutation est appelé **allèle morbide**.
Quand la mutation du gène entraîne une maladie, on parle d'**allèle morbide**.
- Un individu possédant deux allèles identiques à un locus donné est dit **homozygote**.
- Un individu possédant 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). A

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.

I.3 LA DOMINANCE ET LA RÉCESSIVITÉ DES ALLÈLES

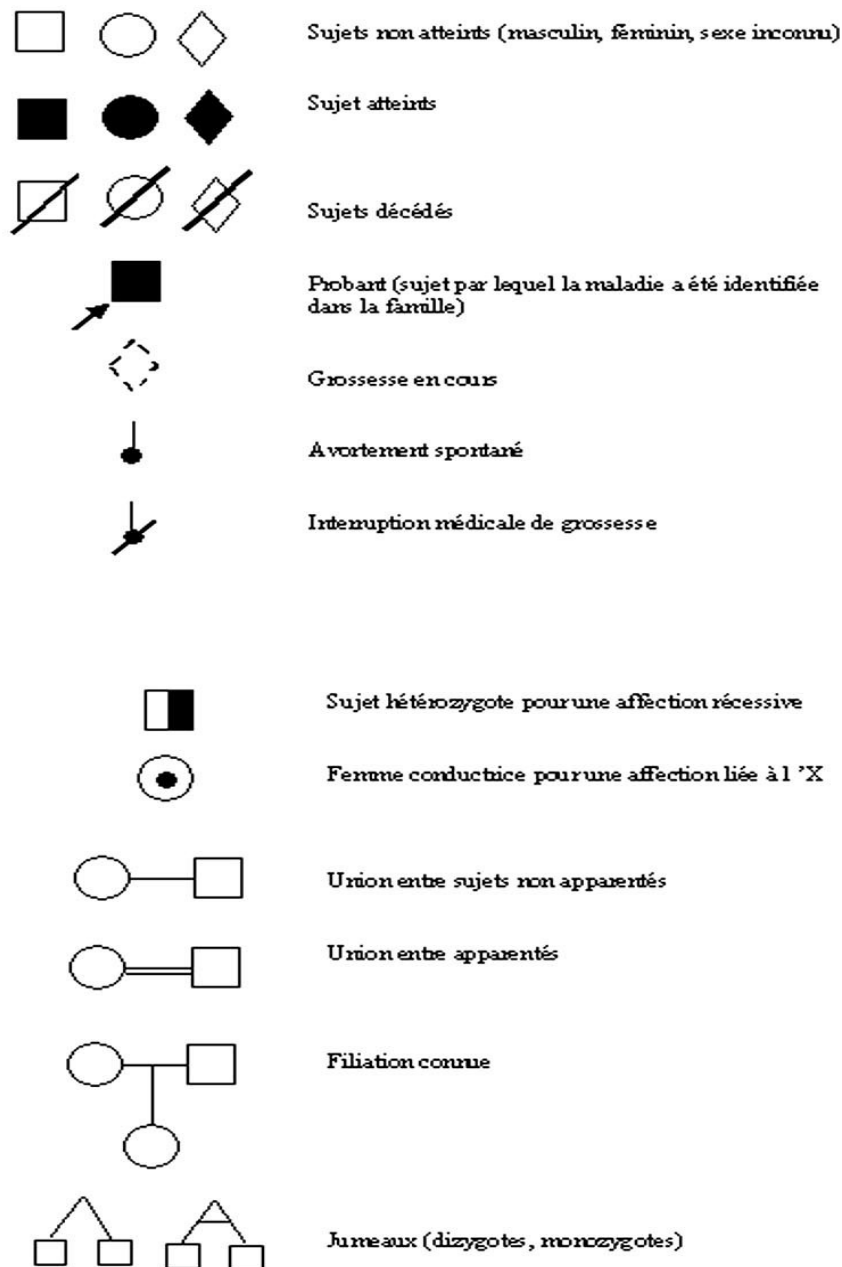
Les notions de dominance et de récessivité sont fondamentales pour comprendre l'hérédité monogénique; elles définissent les relations entre les deux allèles situés au même locus sur des chromosomes homologues.

- 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 2 allèles sont dits **co-dominants** (c'est le cas des groupes sanguins A et B).

I.4 L'ARBRE GÉNÉALOGIQUE

La construction de l'arbre généalogique utilise les symboles internationaux représentés sur la **figure 1**.

Figure 1. Principaux symboles utilisés pour la réalisation d'un arbre généalogique



II HÉRÉDITÉ AUTOSOMIQUE DOMINANTE

II.1 DÉFINITION

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

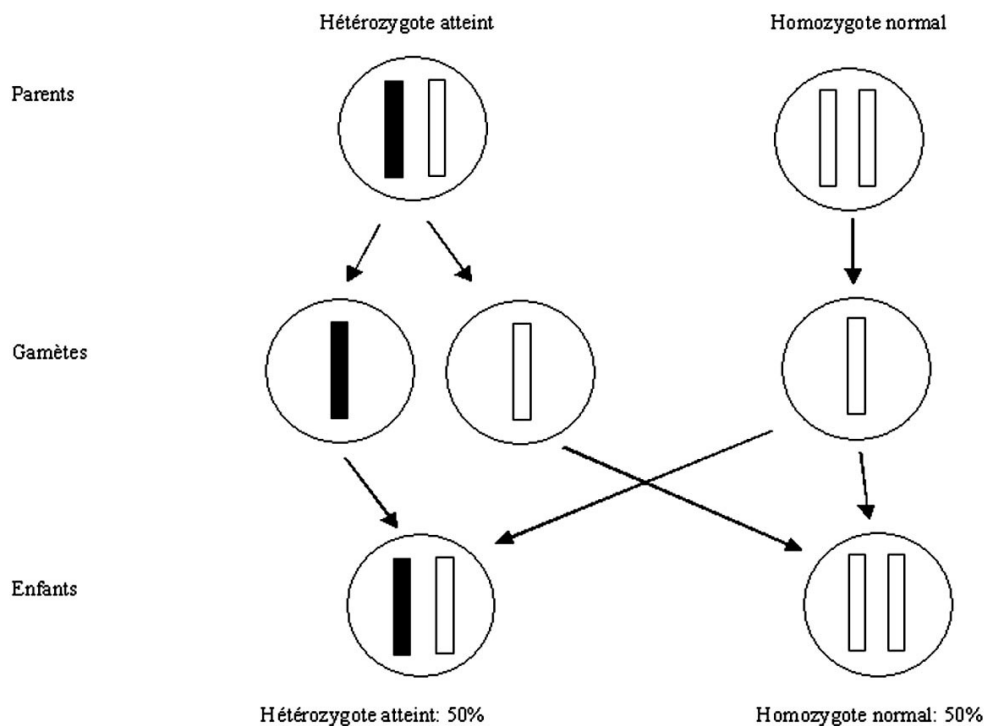
L'allèle muté responsable de la maladie est dominant sur l'allèle 'sauvage': la maladie s'exprime chez les hétérozygotes.

En pathologie humaine, les situations où l'on observe des homozygotes pour des allèles mutés responsables de pathologies dominantes sont très rares; cette situation peut conduire à un phénotype identique ou plus sévère.

II.2 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉALOGIQUES DES MALADIES AD

- Les deux sexes sont atteints avec la même fréquence.
- La transmission de la maladie peut se faire par les deux sexes.
- Les transmissions père-fils sont pathognomoniques de l'hérédité AD.
- Tout sujet porteur d'un allèle morbide AD a un risque de 50% (1/2) de le transmettre à ses enfants quelque soit leur sexe. (**figure 2**)
- Les sujets atteints se retrouvent sur plusieurs générations et leur répartition apparaît verticale sur l'arbre généalogique.

Figure 2. Représentation schématique de la transmission d'une maladie autosomique dominante (l'allèle morbide est en noir)



II.3 EXEMPLES DE MALADIE AD

- Hypercholestérolémie familiale : maladie due à une anomalie du gène du récepteur pour le LDL cholestérol (19p13)
- Achondroplasie : nanisme dû à une mutation dans le gène FGFR3 (4p16.3).
- Maladie de Marfan: affection touchant notamment le squelette, l'oeil, les gros vaisseaux et due à des mutations dans le gène de la fibrilline 1 (15q21).
- Chorée de Huntington: maladie neurologique dégénérative de l'adulte (4p16).
- Ostéogénèse imparfaite: maladie avec fragilité osseuse due à une anomalie du 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 (17q11).
- Certaines prédispositions pour les cancers se transmettent comme des caractères dominants; c'est le cas, par exemple, de 10% des cancers du sein, de certains cancers du colon, des formes familiales de cancers médullaires de la thyroïde et des formes familiales de rétinoblastome (cancer de la rétine de l'enfant).

II.4 PARTICULARITÉS DE L'HÉRÉDITÉ AD

II.4.1 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.
- 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.

II.4.2 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 peuvent varier chez les membres d'une même famille.

II.4.3 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.

II.4.4 Mosaïques germinales

Le mosaïcisme germinale est défini par la présence d'une double population de gamètes, certains étant porteurs de l'allèle muté, d'autres de l'allèle sauvage.

Le parent porteur d'une mutation germinale en mosaïque peut la transmettre à sa descendance. Si cette mutation est absente de ses cellules somatiques, la maladie ne s'exprimera pas du tout chez lui.

Ce concept est d'une grande importance pour le conseil génétique puisqu'il signifie que des personnes, non porteuses en apparence de la mutation, peuvent avoir plusieurs enfants atteints.

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

II.5 MÉCANISMES DE LA DOMINANCE

- *Mutations avec perte de fonction ou haplo-insuffisance*

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

Exemple : dans l'hypercholestérolémie familiale, la présence de la moitié des récepteurs LDL ne suffit pas pour obtenir un taux circulant normal de LDL cholestérol.

- *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'ostéogénèse imparfaite où la formation du collagène de type I qui est une protéine multimérique (assemblage de 3 molécules) est fragilisée par la présence d'une molécule anormale.

III HÉRÉDITÉ AUTOSOMIQUE RÉCESSIVE

III.1 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.

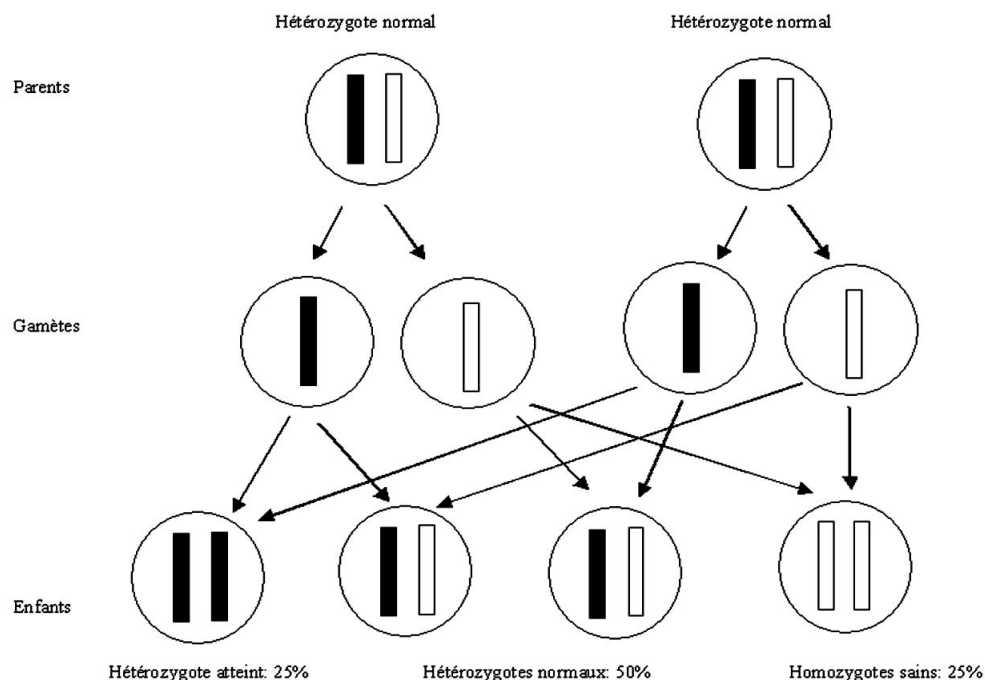
III.2 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉALOGIQUES DES MALADIES AR

- 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.

III.3 RISQUE DE RÉCURRENCE

Un couple d'hétérozygotes a un risque de 25% (1/4) d'avoir un enfant atteint à chaque nouvelle conception (figure 3).

Figure 3. Représentation schématique de la transmission d'une maladie autosomique récessive (l'allèle morbide est en noir)



III.4 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.
- La plupart des maladies héréditaires du métabolisme dues à des anomalies enzymatiques sont AR. (ex: la phénylcétonurie (12q24)).

III.5 PARTICULARITÉS DE L'HÉRÉDITÉ AR

1. 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.

2. 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.

IV 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.

IV.1 HÉRÉDITÉ RÉCESSIVE LIÉE À L'X (RLX)

IV.1.1 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 **hémizygotés**).

IV.1.2 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.

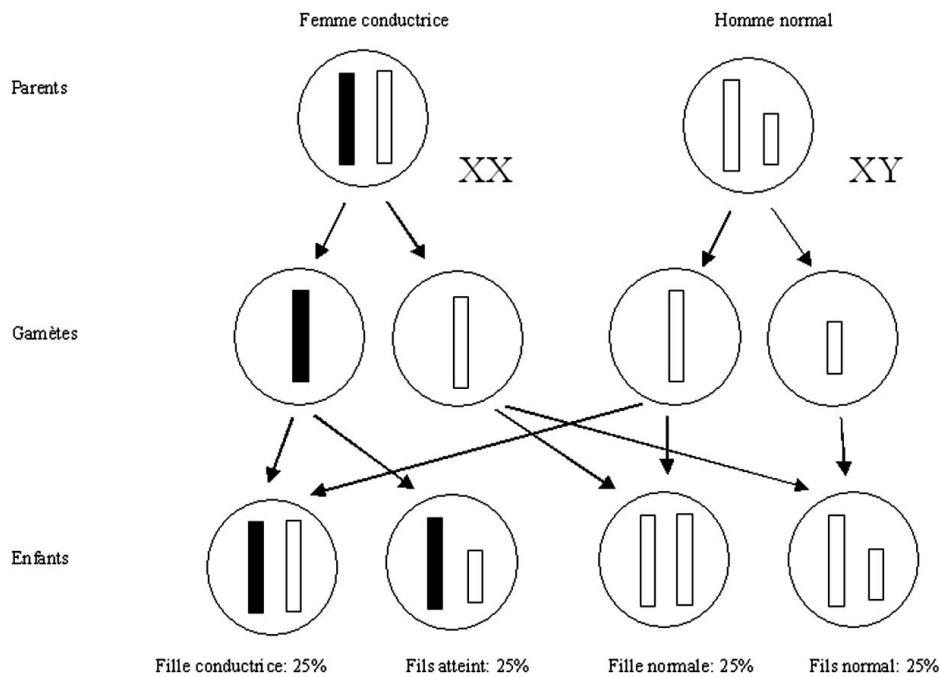
IV.1.3 Risques de récurrence (figure 4)

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.

Figure 4. Représentation schématique de la transmission d'une maladie récessive liée à l'X (le chromosome X portant l'allèle morbide est en noir)



IV.1.4 Exemples de maladie RLX

- Dystrophie musculaire de Duchenne : maladie musculaire entraînant une atteinte progressive de pratiquement tous les muscles (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 globule rouge (Xq27).

IV.1.5 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.

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.

IV.2 HÉRÉDITÉ DOMINANTE LIÉE À L'X (DLX)

IV.2.1 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).

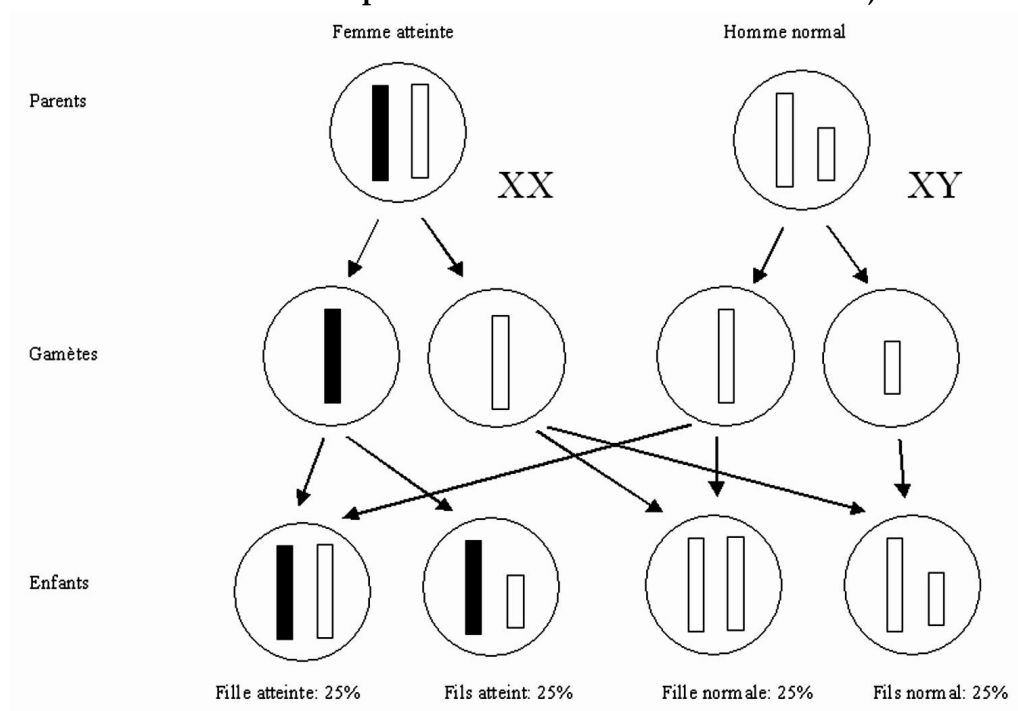
IV.2.2 Caractéristiques généalogiques des maladies DLX et risque de récurrence (figure 5)

Les deux sexes peuvent être touchés par la maladie

- En général, les filles hétérozygotes sont moins sévèrement malades que les garçons.
- 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.

Figure 5. Représentation schématique de la transmission d'une maladie dominante liée à l'X (Le chromosome X porteur de l'allèle morbide est en noir)



IV.2.3 Exemples de maladies DLX

- Syndrome de l'X fragile : cause très fréquente de retard mental (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.
- Rachitisme vitamino-résistant hypophosphatémique par anomalie du récepteur de la vitamine D (Xq22).
- Déficit en ornithine transcarbamylyase (OTC) (Déficit enzymatique sur le cycle de l'urée) (Xp11).

Les maladies génétiques "complexes"

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Dr Francis Vasseur

Maître de Conférences en Génétique Praticien Hospitalier

Clinique de Santé Publique - Pôle S3P

Parc Eurasanté

CHRU de Lille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Présentation.....	4
II	La maladie génétique "complexe" est plus complexe que prévu.....	6
III	Quand évoquer une maladie génétique "complexe" ?.....	7
III.1	La maladie présente un déterminisme génétique.....	7
III.1.1	La notion d'agrégation familiale.....	7
III.1.2	La concordance des jumeaux.....	7
III.1.3	L'existence d'ethnies à risque.....	8
III.1.4	L'existence de modèles animaux.....	8
III.2	Le mode de transmission ne répondant à aucun des schémas de transmission de maladie monogénique ou mitochondriale, la maladie est dite "complexe"	9
IV	Maladie génétique "complexe" et phénotype quantitatif continu.....	10
V	Où s'arrête la variabilité interindividuelle et où commence la maladie multifactorielle, la maladie génétique "complexe" ?.....	11
V.1	Définition arbitraire et mathématique des états "normaux" et "pathologiques"	11
V.2	Les caractères multifactoriels avec effet de seuil.....	12
V.3	Définition de la limite pathologique par la survenue de comorbidités.....	12
V.4	La notion de seuil et l'agrégation familiale.....	14
VI	Quelques exemples de maladies génétiques "complexes"	15
VII	L'identification des facteurs génétiques multiples impliqués dans une maladie génétique "complexe"	15
VII.1	La stratégie gène candidat.....	15
VII.2	L'approche génome entier (Genome Wide Scan).....	17
VII.3	L'approche "Genome Wide Association Study" (GWAS).....	20
VII.4	Le "Whole Exome Sequencing"	23
VIII	En finir avec l'héritabilité manquante ?.....	24

IX Conclusions.....	26
X Annexes.....	28

I PRÉSENTATION

On qualifie de maladies génétiques complexes, les maladies qui possèdent un déterminisme manifestement génétique mais dont la transmission ne correspond à aucun des modes mendéliens classiques de transmission, ni à un mode de transmission de type mitochondrial.

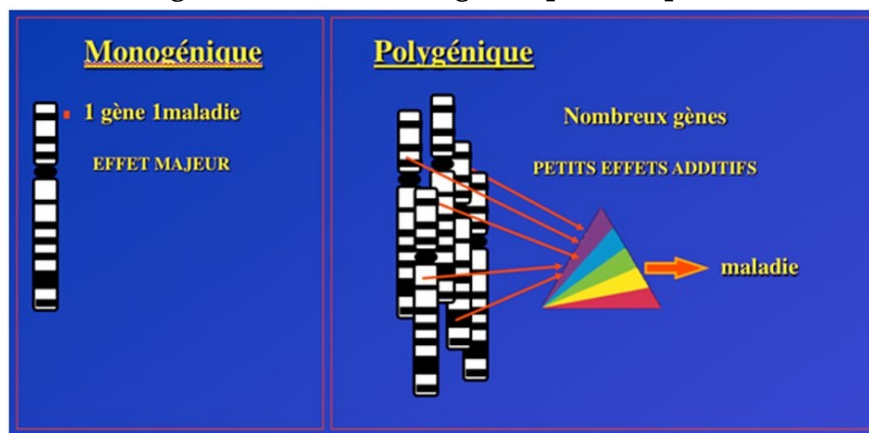
En effet si l'on peut résumer la maladie génétique monogénique à un modèle "simple" (par opposition aux maladies génétiques "complexes"):

l'altération au niveau d'un gène est nécessaire et suffisante pour s'accompagner de l'apparition de la maladie génétique (exception faite des mutations à pénétrance non complète),

dans les maladies génétiques complexes il s'agit d'un déterminisme génétique polygénique:

de nombreuses altérations aux niveaux de nombreux gènes sont les déterminants multiples de la maladie. On parle aussi de maladie "multifactorielle".

Figure 1 : Les maladies génétiques complexes



Chaque effet individuel de chacune des altérations génétiques est à lui seul insuffisant pour induire à la maladie. C'est la présence simultanée de ces altérations génétiques chez un même patient qui conduit à l'apparition de la maladie.

Dans ce contexte de maladie multifactorielle on attribue aussi une part non négligeable à l'"environnement" dans le déterminisme de la maladie génétique "complexe".

L'environnement étant à prendre au sens très large: ce qui environne ou a environné le patient ainsi que certains aspects du mode de vie du patient. La partie génétique du déterminisme de la maladie peut être considérée comme une susceptibilité, une prédisposition génétique à la maladie.

Figure 2 : Maladie génétiques complexes "Multifactorielle"



Il est possible de relier ces concepts à des notions mathématique et statistique et notamment ce qui est appelé la "part de variance expliquée". Dans une situation idyllique où nous connaissons à la fois tous les éléments génétiques qui constituent la composante polygénique ainsi que tous les déterminants "environnementaux" d'une maladie génétique "complexe" il serait possible de construire un modèle mathématique qui relierait de manière univoque la maladie (comme variable à expliquer) à n variables génétiques et n' variables environnementales (comme variables explicatives).

$$Y (\text{maladie}) = f (X_1\text{gène1}, X_2\text{gène2}, \dots, X_n\text{gène } n)$$
$$(X'_1\text{environnement1}, X'_2\text{environnement2}, \dots, X'_n \text{ environnement } n)$$

Ce modèle ne présentant plus aucune part d'incertitude, on dit qu'il expliquerait 100% de la variance de la maladie. Cette variance de la maladie se décompose en deux "sous variances" : la variance résultant des facteurs "environnementaux" et celle résultant des facteurs génétiques. Cette variance génétique est plus connue sous le terme d'héritabilité. Il existe des méthodes mathématiques indirectes pour estimer la valeur de l'héritabilité d'une maladie génétique "complexe" et ainsi avoir une idée du poids de la génétique dans une maladie donnée. Quant à la variance "environnementale" qui estime le poids de l'environnement dans le déterminisme d'une maladie génétique "complexe" on l'estime généralement par différence:

$$\text{Variance environnementale} = \text{Variance totale} - \text{Héritabilité.}$$

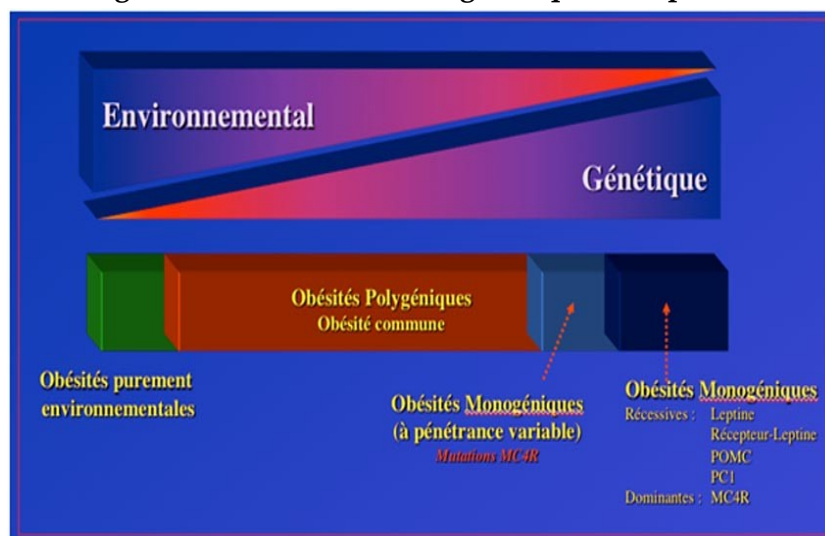
Il apparaît donc bien que derrière le terme "environnemental" soient regroupés tous les déterminants non génétiques dans une maladie génétique "complexe". Le terme "environnemental" est donc bien à prendre au sens très large: à la fois dans son sens écologique (l'environnement que subit ou a subit le patient) mais aussi dans un sens plus individuel (ce que le patient vit ou a vécu, compte tenu de son comportement présent et passé).

II LA MALADIE GÉNÉTIQUE "COMPLEXE" EST PLUS COMPLEXE QUE PRÉVU

On est amené à penser que certaines maladies génétiques "complexes" présenteraient une part imputable à la génétique (héritabilité) plus importante que d'autres. Ceci est certainement une réalité mais les choses s'avèrent encore plus complexes puisque pour une même entité clinique les parts respectives de "génétique" et d'"environnemental" sont variables d'un patient à un autre.

Cette notion transparaît bien pour l'obésité qui est reconnue comme une entité clinique et une maladie génétique "complexe" dont les déterminants génétiques peuvent être multiples et dont au moins une partie de la composante "environnementale" est identifiable sous la forme du mode de vie (activité physique, sédentarité, stress...), du type d'alimentation et du comportement vis à vis de la nourriture (dans la mesure où ce comportement n'est pas déterminé par des facteurs génétiques). Il apparaît que les contributions génétiques et environnementales dans le déterminisme de l'obésité sont très variables d'un patient à l'autre, allant du "tout génétique" avec des formes monogéniques d'obésité à transmission autosomique récessive (mutations du gène de la leptine *LEP* OMIM164160, du récepteur de la leptine *LEPR* OMIM601007, de la pro-opiomélanocortine *POMC* OMIM176830, de la proprotéine convertase1 *PCSK1* OMIM162150) à transmission autosomique dominante (mutations du gène codant le récepteur 4 aux mélanocortines *MC4R* OMIM155541) aux formes d'obésité purement environnementales en passant par des formes monogéniques à pénétrance variable et bien sûr les obésités polygéniques qui représentent les formes génétiques "complexes" de la maladie.

Figure 3 : Obésité : maladie génétique "complexe"



III QUAND ÉVOQUER UNE MALADIE GÉNÉTIQUE "COMPLEXE" ?

Avant d'avancer la nature génétique "complexe" d'une maladie il faut évidemment au préalable disposer d'arguments solides.

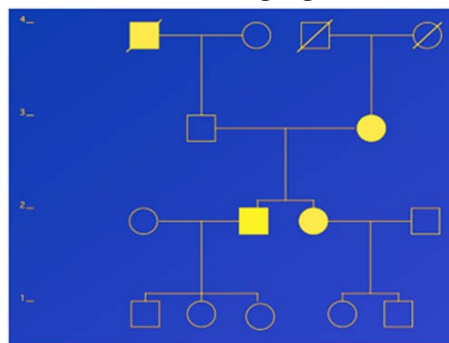
III.1 LA MALADIE PRÉSENTE UN DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE

Les arguments qui font penser à un déterminisme génétique sont essentiellement de nature épidémiologique.

III.1.1 La notion d'agrégation familiale

La maladie récidive dans des familles et se présente chez de nombreux sujets de la famille. La prévalence de la maladie dans la famille est nettement supérieure à la prévalence observée dans la population générale.

Figure 4 : La notion d'agrégation familiale



En savoir plus: Demenais, F., Martinez, M., and Lathrop, M. (1996). Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles. Ann Instit Pasteur, 7(1):3-12. Feingold, J. (2005). Maladies multifactorielles: un cauchemar pour le généticien. Med Sci, 11(21):927-33.

III.1.2 La concordance des jumeaux

Dans le cas de jumeaux monozygotes, quand l'un des jumeaux présente la maladie, très souvent le second la développe aussi. La concordance des jumeaux monozygotes atteint 80 à 90%. Cette concordance est moindre dans le cas de jumeaux dizygotes, de l'ordre de 16 à 40% ce qui permet de suspecter fortement une composante génétique de la maladie.

B. Newman et al., Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. Diabetologia 30 (1987), pp. 763-768.

III.1.3 L'existence d'ethnies à risque

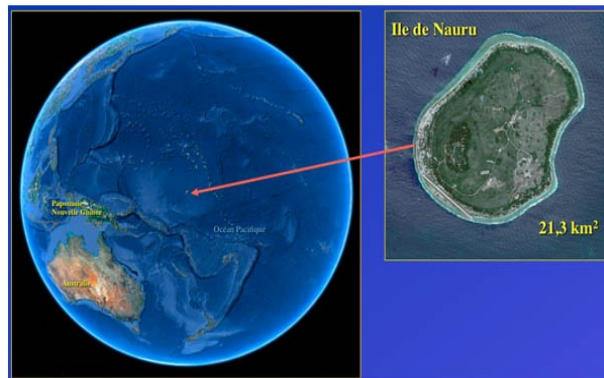
Dans certaines ethnies la prévalence de maladies complexes est nettement plus élevée. C'est par exemple le cas du diabète de type 2 chez les indiens Pima d'Arizona où près de 50% des sujets présentent un diabète de type 2 et 95% des diabétiques sont obèses

Prevalence of diabetes in Mexican Americans. Relationship to percent of gene pool derived from native American sources. Gardner LI Jr, Stern MP, Haffner SM, Gaskill SP, Hazuda HP, Relethford JH, Eifler CW. Diabetes. 1984 Jan;33(1):86-92.

C'est également le cas des habitants de l'île de Nauru dans l'océan Pacifique où près de 90% de la population souffre d'obésité avec de ce fait une espérance de vie très faible, de 58 ans pour les hommes et 65 ans pour les femmes.

Dans ces deux exemples on admet que ces populations partagent un patrimoine génétique qui leur confère la susceptibilité à la maladie génétique "complexe" en question (diabète de type 2, obésité). On admet également que ces populations n'ont eu que peu d'apport génétique extérieur à même de "diluer" cette susceptibilité génétique. Il s'agit soit d'un isolat culturel dans le cas des indiens Pima d'Arizona, soit d'un isolat géographique dans celui des habitants de l'île de Nauru.

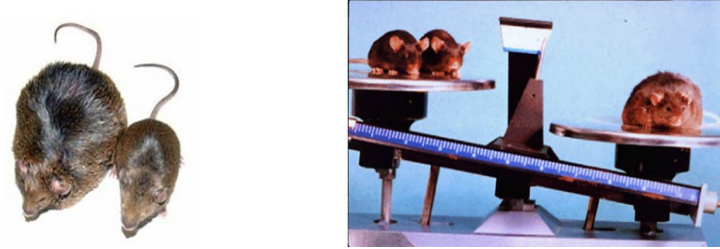
Figure 5 : L'existence d'ethnies à risque



III.1.4 L'existence de modèles animaux

Il existe de nombreux modèles animaux de maladies humaines. Des souches animales présentent spontanément des modèles génétiquement transmissibles de maladies humaines. C'est le cas par exemple des rats Zucker qui sont des modèles animaux d'obésité génétique. C'est d'ailleurs à partir de la souche Zucker que fut cloné et identifié le gène de la leptine. En effet les rats Zucker présentent une mutation (appelée fa, pour fat) du gène codant la leptine. Les rats fa/fa sont obèses et peuvent peser jusqu'à un kilogramme, soit le double de la souche sauvage. *TW Kurtz, The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension, Hypertension, vol. 13, no 6, 1989, p. 896-901.*

Figure 6 : L'existence de modèles animaux

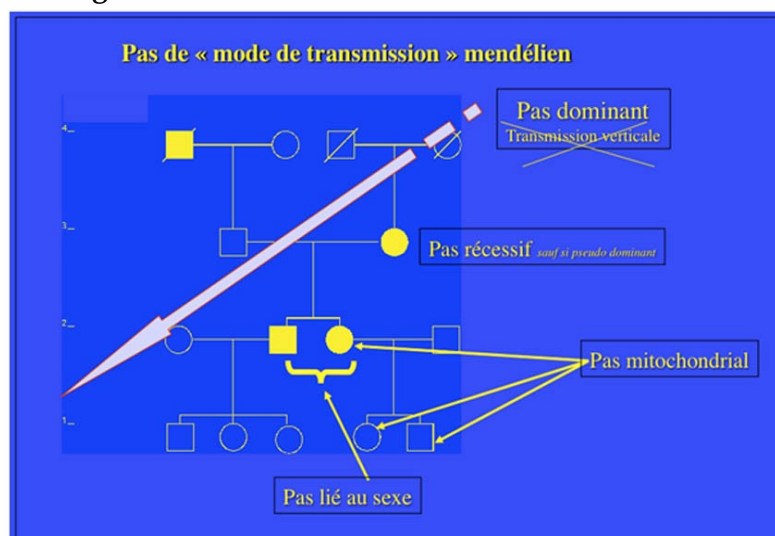


Si le rat Zucker est un modèle animal d'obésité monogénique, il existe des modèles animaux de maladies génétiques "complexes" comme le rat Goto-Kakizaki (GK) qui est un modèle animal de diabète de type 2. Les travaux réalisés chez le rat GK ont permis en 1996 de démontrer que le diabète de type 2 comportait (au moins chez le rat) un déterminisme polygénique. *Galli J et al. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. Nat Genet. 1996 Jan;12(1):31-7.* De même la souche de souris KK/Ta représente un modèle animal de diabète de type 2 associé à l'obésité, et il existe des modèles murins d'athérosclérose. *Roberts A, Thompson JS. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. Adv Exp Med Biol. 1976;67(00):313-327.*

III.2 LE MODE DE TRANSMISSION NE RÉPONDANT À AUCUN DES SCHÉMAS DE TRANSMISSION DE MALADIE MONOGÉNIQUE OU MITOCHONDRIALE, LA MALADIE EST DITE "COMPLEXE"

On constate une forte agrégation familiale mais la transmission ne correspond à aucun grand mode de transmission mendélien (autosomique dominant, autosomique récessif, récessif lié au chromosome X) ni à une transmission mitochondriale.

Figure 7 : Pas de mode de transmission mendélien



En effet la maladie génétique "complexe" étant le résultat des effets combinés de très nombreux variants génétiques, comme chacun d'entre eux considéré individuellement se transmet selon les lois de la génétique mendélienne classique et sur un mode récessif,

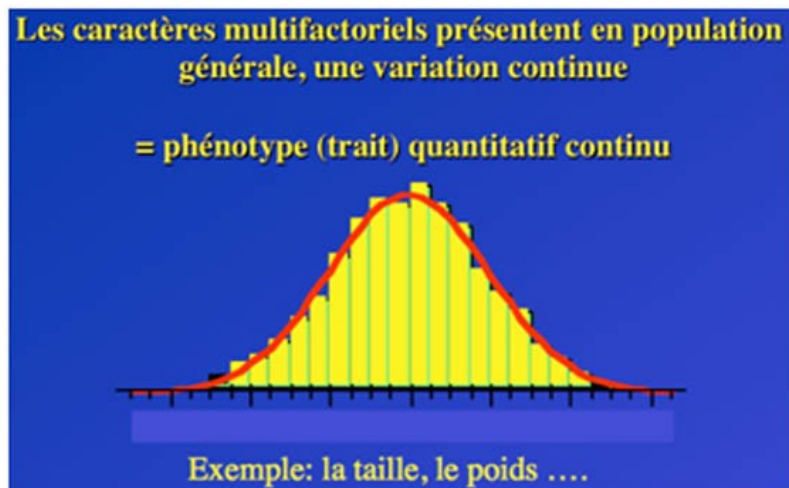
codominant ou dominant, l'hérédité polygénique est une hérédité mendélienne à de multiples loci. Mais globalement la résultante ne correspond à aucun modèle mendélien. Concernant l'hérédité polygénique, on admet par simplification que les effets des différents loci sont additifs ce qui conduit à parler d'hérédité *quantitative*. Il en résulte un phénotype très variable d'un individu à l'autre avec une tendance à obtenir un phénotype qui suit une distribution normale en population générale.

IV MALADIE GÉNÉTIQUE "COMPEXE" ET PHÉNOTYPE QUANTITATIF CONTINU

L'hérédité polygénique des maladies génétiques "complexes" est appelée hérédité multifactorielle, hérédité quantitative. En dehors d'un contexte pathologique les phénotypes sont généralement caractérisés par une variable numérique continue: par exemple la taille des individus, qui peut se définir par une valeur numérique, est un trait (phénotype) polygénique multifactoriel (<http://www.uic.edu/classes/bms/bms655/lesson11.html> : <http://www.uic.edu/classes/bms/bms655/lesson11.html>).

La taille des individus en population générale peut prendre une infinité de valeurs, c'est donc en termes statistiques une *variable aléatoire continue* qui peut se définir par sa moyenne et sa déviation standard (DS) (dans la mesure où sa distribution suit une loi normale). Les situations sont analogues pour d'autres phénotypes comme la couleur de peau et l'indice de masse corporelle.

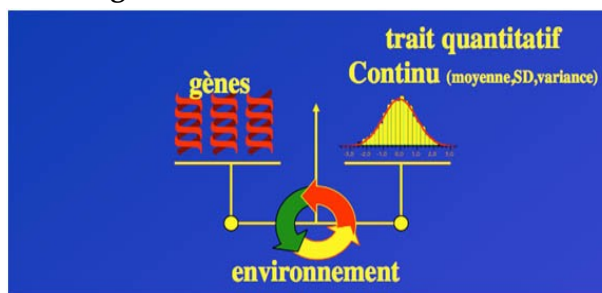
Figure 8 : Phénotype quantitatif continu



V OÙ S'ARRÊTE LA VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE ET OÙ COMMENCE LA MALADIE MULTIFACTORIELLE, LA MALADIE GÉNÉTIQUE "COMPLEXE" ?

On admet que pour chaque maladie génétique complexe il doit correspondre un phénotype quantitatif continu dont la variation en population devrait permettre de définir les états normaux et pathologiques. Ce phénotype quantitatif étant sous la dépendance d'une hérédité multifactorielle la pathologie est donc bien de nature "complexe", à la fois polygénique et environnementale.

Figure 9 : Maladie multifactorielle

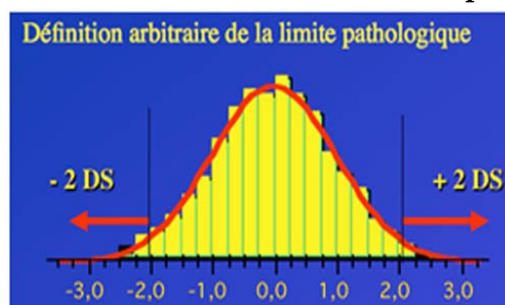


En savoir plus: Plomin R et al.. Common disorders are quantitative traits. *Nature Reviews Genetics* 10, 872 (2009). doi:10.1038/nrg2670.

V.1 DÉFINITION ARBITRAIRE ET MATHÉMATIQUE DES ÉTATS "NORMAUX" ET "PATHOLOGIQUES"

Pour de nombreux caractères multifactoriels il n'existe pas de méthode neutre et objective pour définir la limite entre un état normal et une situation pathologique qui doit en principe déclencher une prise en charge médicale. C'est le cas notamment des paramètres biochimiques comme la triglycémie, la cholestérolémie... Dans ces situations le "pathologique" est alors défini arbitrairement par les valeurs situées en dehors de la fourchette $-2DS/+2DS$ de la distribution du paramètre en population générale.

Figure 10 : Définition arbitraire de la limite pathologique



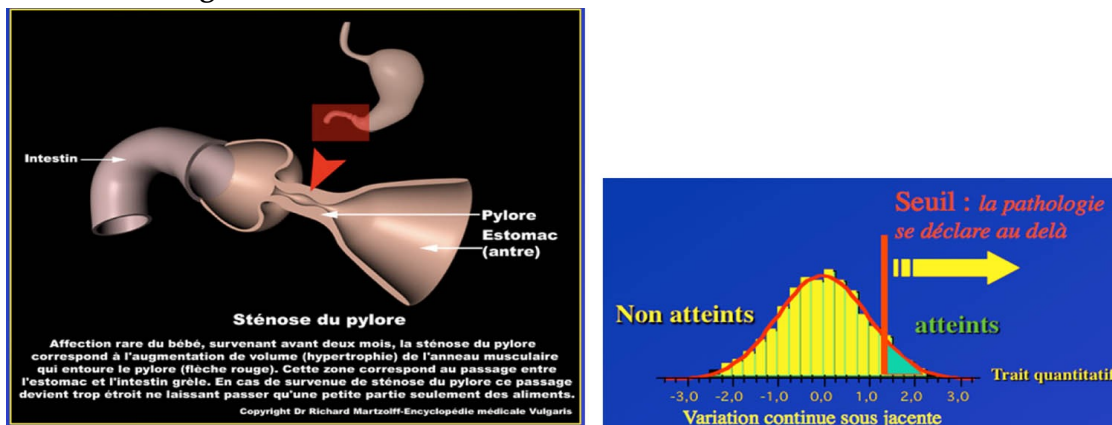
Dans ce contexte, l'intervalle $-2DS/+2DS$ qui correspond aux *valeurs normales* du paramètre, regroupe par définition mathématique et statistique, 95% de la population, le corollaire de

cette définition étant que 5% des sujets sont systématiquement dans la zone dite *pathologique*.

V.2 LES CARACTÈRES MULTIFACTORIELS AVEC EFFET DE SEUIL

Pour certains caractères multifactoriels une situation pathologique évidente se déclare au delà d'un seuil sans qu'il soit besoin de définir des *valeurs normales* en population générale. C'est le cas de la sténose du pylore qui est le rétrécissement au niveau de la jonction estomac - intestin, sténose résultant de l'hypertrophie du muscle qui entoure cette zone. Le développement de ce muscle est sous hérédité multifactorielle et on peut admettre que son épaissement suit une certaine distribution (loi normale ?) en population générale. Le seuil pathologique correspond au maximum d'hypertrophie du muscle et donc au maximum de rétrécissement du pylore compatible avec une fonction physiologique non altérée.

Figure 11 : Les caractères multifactoriels avec effet de seuil



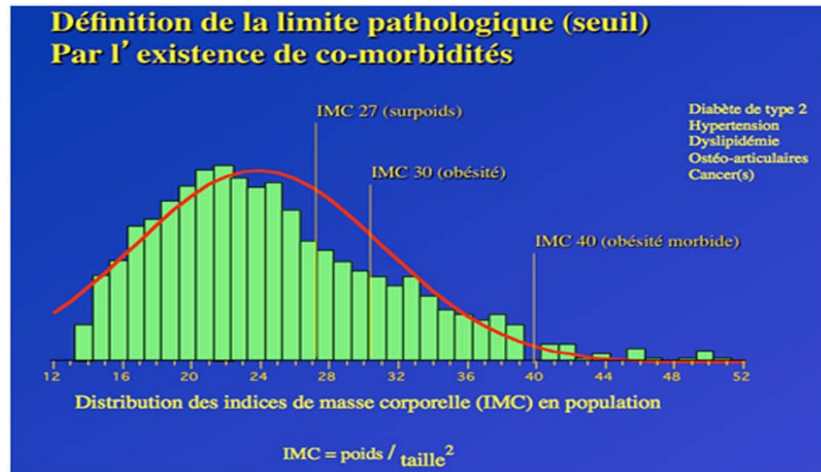
V.3 DÉFINITION DE LA LIMITE PATHOLOGIQUE PAR LA SURVENUE DE COMORBIDITÉS

Pour certaines maladies génétiques "complexes" comme l'obésité ou le diabète de type 2 la valeur en soi du paramètre quantitatif sous jacent (l'indice de masse corporelle, IMC, la glycémie) ne possède pas de réel seuil physiologique au delà duquel le sujet aurait un ressenti pathologique qui l'amènerait à consulter, ce ne sont pas des caractères multifactoriels à effet de seuil. Pour ces maladies génétiques "complexes" la communauté d'experts médicaux n'a pas opté pour la définition statistique du pathologique sur la base de la déviation standard (DS) mais sur des seuils consensuels au delà desquels l'expérience a montré la survenue de comorbidités ou l'exacerbation des comorbidités.

Pour l'obésité qui peut se définir comme un excès de masse grasse généralement estimée indirectement par la détermination de l'indice de masse corporelle (IMC), un excès de masse grasse ne déclenche pas automatiquement un état pathologique mais les études épidémiologiques ont pu montrer la survenue de comorbidités (diabète de type 2,

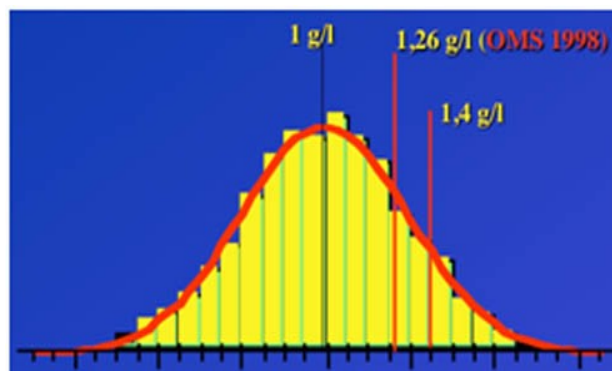
hypertension, dyslipidémie, problèmes ostéo-articulaires, cancers...) au delà d'un IMC de 27 qui est admis comme seuil de *surpoids*. Au delà d'un IMC de 30 la fréquence des comorbidités augmente, et ce seuil de 30 définit l'*obésité*. Au delà d'un IMC de 40 la fréquence des comorbidités devient si grande que le pronostic vital peut être à terme compromis, d'où la définition du seuil de 40 comme celui de l'*obésité morbide*.

Figure 12 : Définition de la limite pathologique



Pour le diabète de type 2, la glycémie à jeun est le paramètre numérique continu dont l'hérédité est multifactorielle. Ce paramètre suit une certaine distribution en population générale. Dans l'absolu on peut considérer qu'une hyperglycémie n'est pas en soi pathologique mais que ce sont les comorbidités et les complications (coronaropathie, neuropathie, néphropathie, atteintes rétinienne...) résultant d'une hyperglycémie chronique qui constituent la pathologie. Dans ce contexte il avait été établi un seuil de glycémie de 1.4g/l au delà duquel le sujet "devenait" un patient diabétique qu'il convenait de traiter afin d'équilibrer sa glycémie pour prévenir les comorbidités. Des études épidémiologiques de grande ampleur ont révélé par la suite que le risque de mortalité coronarienne, d'atteintes rénales et rétinienne était multiplié par deux chez les sujets dont la glycémie à jeun se situait au delà de 1.26g/l. Ces données ont amené en 1998 la communauté médicale à rabaisser le seuil pathologique à 1.26g/l.

Figure 13 : Définition de la limite pathologique



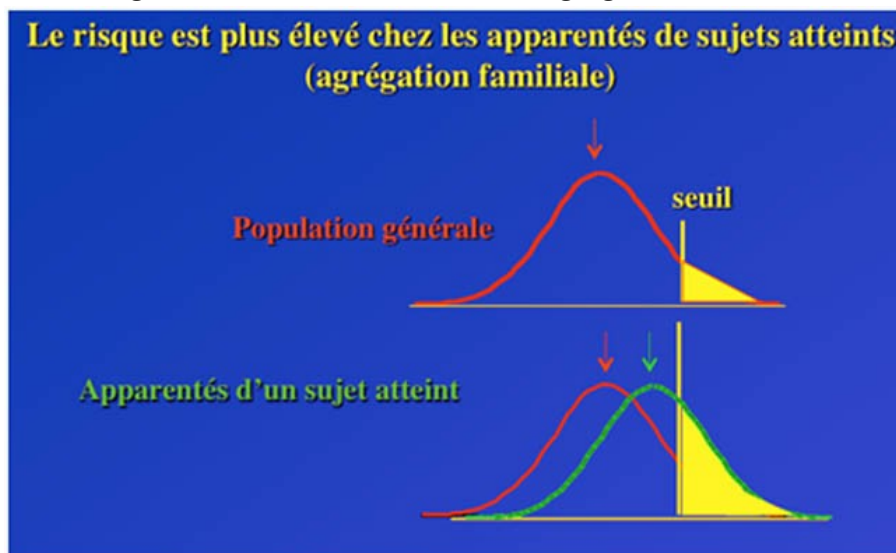
Cet exemple montre toute la difficulté à définir parfois un seuil pathologique dans les maladies génétiques "complexes".

En savoir plus: D. Chevenne, F. Trivoin, Le diabète sucré : propositions de nouvelles normes de diagnostic et de classification. Annales de Biologie Clinique. Volume 56, Numéro 4, 463-70, Juillet - Août 1998, Pratique quotidienne, http://www.jle.com/fr/revues/bio_rech/abc/e-docs/00/00/C5/9C/article.phtml .

V.4 LA NOTION DE SEUIL ET L'AGRÉGATION FAMILIALE

Les sujets apparentés partagent de nombreux facteurs génétiques y compris les facteurs de susceptibilité à une maladie génétique "complexe". Dans une famille qui présente au moins un sujet atteint de maladie génétique "complexe", la fréquence des variants génétiques de susceptibilité à la maladie est en général plus élevée que dans la population générale. Les sujets de cette famille auront donc une probabilité plus élevée de présenter ces variants génétiques. Comme ces variants génétiques déterminent la valeur du trait quantitatif sous jacent à la pathologie, les apparentés présenteront des valeurs augmentées du trait quantitatif, au prorata du nombre d'allèles de susceptibilité. Dans ces familles la distribution du paramètre quantitatif sera déplacée vers les valeurs élevées et de ce fait comparé à la population générale, une plus grande proportion de sujets seront au delà du seuil pathologique.

Figure 14 : La notion de seuil et l'agrégation familiale



VI QUELQUES EXEMPLES DE MALADIES GÉNÉTIQUES "COMPLEXES"

Il existe un très grand nombre de phénotypes quantitatifs à déterminisme polygénique multifactoriel, chacun pouvant être à priori associé à une pathologie: la fente labiale et palatine, la luxation congénitale de la hanche, certains cancers, les cardiopathies congénitales, les anomalies de fermeture du tube neural, certaines épilepsies, le glaucome, l'hypertension, les cardiopathies ischémiques, la maladie de Crohn, l'ostéoporose, des maladies mentales comme la schizophrénie et la psychose maniaco-dépressive, toutes les pathologies qui reposent sur l'anomalie d'un paramètre biochimique (HDL LDL cholestérol, glycémie...) ... On peut penser que les maladies multifactorielles constituent la grande majorité des pathologies en dehors des maladies infectieuses. Néanmoins comme une certaine variabilité inter individuelle de la susceptibilité aux infections est à déterminisme polygénique, même si la cause de la pathologie reste malgré tout l'agent infectieux, la présentation, la sévérité et l'évolution de la maladie infectieuse peut être considéré à déterminisme polygénique et multifactoriel "complexe".

VII L'IDENTIFICATION DES FACTEURS GÉNÉTIQUES MULTIPLESIMPLIQUÉS DANS UNE MALADIE GÉNÉTIQUE "COMPLEXE"

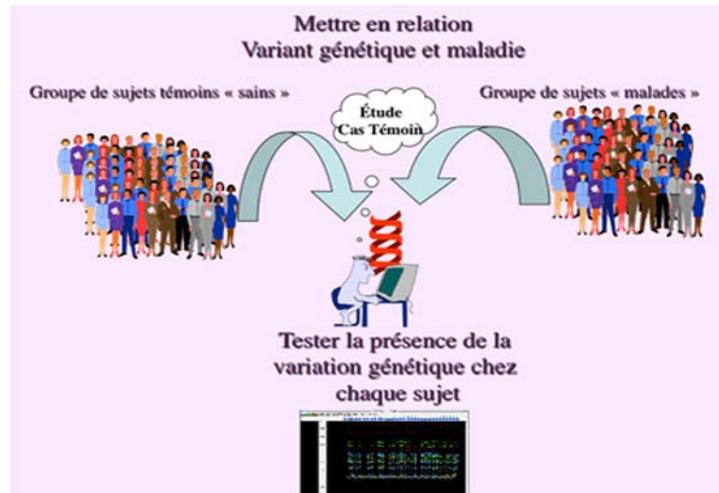
La recherche et la caractérisation des déterminants génétiques impliqués dans les maladies génétiques "complexes" a été initiée dans la décennie 1990 par des travaux qui ont concerné entre autres le diabète de type 2. Compte tenu de la multiplicité des loci potentiellement impliqués, les méthodes employées dans les maladies monogéniques ont dû être adaptées à l'étude de l'hérédité polygénique. On retiendra de cette époque, deux méthodes majeures: la stratégie gène candidat et l'approche génome entier (Genome Wide Scan).

VII.1 LA STRATÉGIE GÈNE CANDIDAT

Cette stratégie consiste à rechercher et analyser les variants génétiques dans des gènes dont la fonction pourrait jouer un rôle dans la pathologie en question. Elle repose sur une bonne connaissance de la physiologie et de la fonction du gène mis en examen et de ses interactions avec les autres partenaires impliqués dans la même voie métabolique qui pourrait être incriminée dans la pathologie. Par exemple le gène *GLUT4* (OMIM138190) codant un transporteur de glucose a été gène candidat dans un contexte de diabète de type 2. Les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation ont été candidats dans le cadre du psoriasis. Une fois le ou les variants génétiques identifiés (en général par séquençage direct de l'ADN de sujets atteints et de sujets non atteints) il reste à conclure sur chacun quant à son rôle (ou son absence de rôle) dans la maladie génétique "complexe". Comme dans la maladie "complexe" chaque variant génétique ne possède qu'un effet

minime sur la variation du trait phénotypique et donc sur la survenue ou non de la maladie, cette phase nécessite une approche épidémiogénétique sur des groupes importants de patients atteints et de sujets témoins indemnes de la maladie (études cas-témoins).

Figure 15 : La stratégie gène candidat



La question posée étant : *le variant génétique est-il plus fréquent chez les sujets présentant la maladie que chez les témoins?*

La réponse à cette question ne peut être objectivée que par un test statistique de comparaison de fréquences au risque 5%, dans notre exemple, un test du χ^2 . Si la réponse est oui, on est en droit de conclure (au risque 5%) que:

- le variant en question est l'un des déterminants génétiques de la maladie
- ou il est en déséquilibre de liaison génétique avec l'un des déterminants génétiques de la maladie.

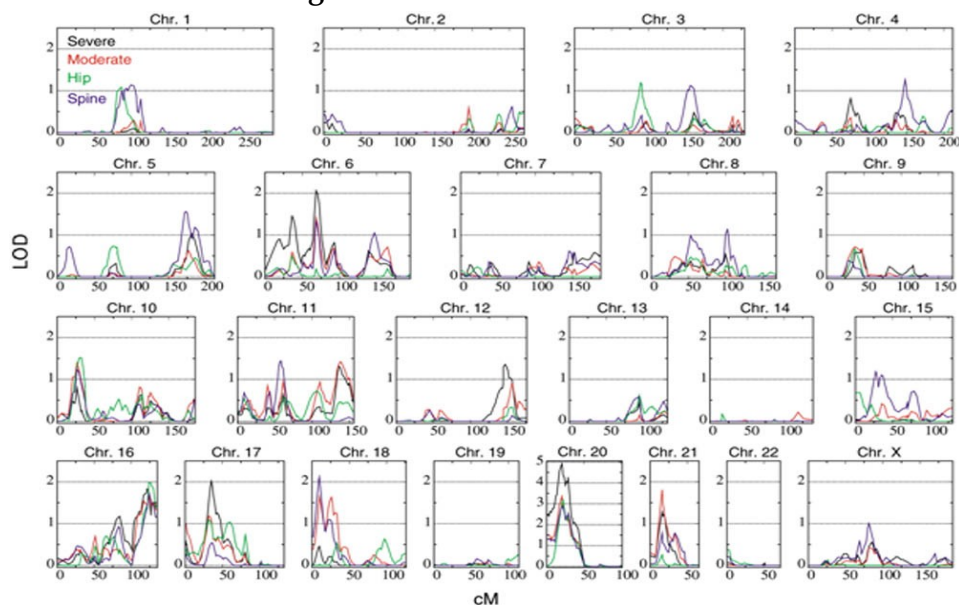
N'ayant aucune information objective et biologique quant au retentissement du variant génétique sur la fonction du gène et sur la maladie, nous ne pouvons à ce stade que constater qu'il existe une association significative au sens statistique entre la présence du variant génétique et la présence de la maladie. C'est pourquoi ces analyses sont appelées **analyses d'association**. Ces analyses d'association peuvent aussi se réaliser par des études familiales: tests de déséquilibre de transmission (Transmission disequilibrium test TDT). On objective par un test statistique la réponse à la question : *le variant génétique est-il transmis d'un parent hétérozygote à un enfant atteint, plus souvent que ne le voudrait le hasard ?*

Ces approches gène candidat qui ont mis en évidence de nombreux variants génétiques impliqués dans des maladies génétiques "complexes", présentent le défaut de ne pouvoir cibler et analyser que les gènes connus dont la fonction est évidemment connue et qui présente un rapport a priori évident avec la pathologie.

VII.2 L'APPROCHE GÉNOME ENTIER (GENOME WIDE SCAN)

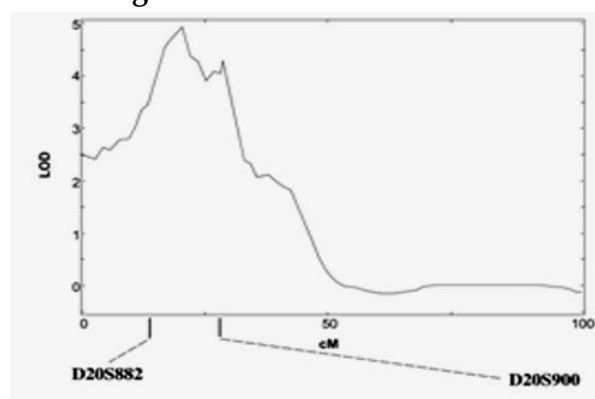
L'approche génome entier consistait à génotyper chez les sujets d'un grand nombre de familles (présentant des patients atteints) un maximum (± 1000) de marqueurs microsatellites très polymorphes, recouvrant la totalité du génome. C'est une méthode de génétique inverse et sans à priori contrairement à l'approche gène candidat. L'étude est basée sur l'analyse de la liaison génétique entre chaque marqueur microsatellite et la maladie "complexe". Par analogie avec le calcul du Lodscore employé dans les maladies monogénique et qui quantifie la liaison génétique entre un locus et la maladie, la méthode Genome Wide Scan quantifie la **liaison génétique** entre chaque marqueur microsatellite et la maladie "complexe". Dans l'exemple ci dessous extrait de Styrkarsdottir U et al. (*Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. PLoS Biol. 2003 Dec;1(3):E69. Epub 2003 Nov 3*), il a été étudié 1100 marqueurs microsatellites en relation avec l'ostéoporose.

Figure 16 : Genome Wide Scan



Les résultats montraient clairement que de nombreux loci présentaient une liaison génétique au moins "suggestive" avec l'ostéoporose, en accord avec la nature polygénique de la maladie. Le maximum de liaison génétique était observé sur le chromosome 20.

Figure 17 : Genome Wide Scan



Une vue détaillée des résultats concernant le chromosome 20 montre que la zone de liaison génétique couvrait presque la moitié du chromosome 20: 50cM soit 50 Mégabases d'ADN (50 000 kb). Les investigations ont été restreintes au pic de liaison génétique compris entre les marqueurs D20S882 et D20S900, la zone à explorer à la recherche d'un (ou plusieurs) variant génétique en rapport avec la maladie restait de 1 726 485 bp (1.7Mb) et même si cela ne représentait plus que 3% du chromosome 20 et 0.05% du génome, cette zone à explorer était encore très grande à l'échelle du biologiste moléculaire puisque compte tenu de la densité des gènes sur le chromosome 20 elle était censée contenir en théorie statistiquement 21 gènes (*Deloukas P. et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. Nature. 2001-27;414(6866):865-71*). Il n'est pas rare que la stratégie gène candidat soit utilisée en seconde intention pour restreindre le nombre de gènes dont l'investigation sera être poussée (stratégie dite gène candidat positionnel). Dans l'exemple présenté la région de 1.7 Mb contenait en fait six gène répertoriés et connus en 2003 (*BMP2, CHGB, LOC51605, C20orf154, C20orf155, et C20orf42*). Compte tenu de son rôle dans la formation de l'os et la différenciation des ostéoblastes le gène BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2 OMIM112261*) est apparu le meilleur gène candidat. Des investigations plus fines ont permis de mettre en évidence une mutation Ser37Ala du gène BMP2, fortement associée à l'ostéoporose mais qui n'expliquait que 30% de la liaison génétique sur le chromosome 20.

On perçoit ici les limites de la méthode qui sont (1) la relative grande taille des régions de liaison génétique (qui n'est pas sans rapport avec la distance entre les microsatellites) et donc le grand nombre de gènes à explorer en détail à la recherche de variants génétiques, (2) la part de liaison restant inexplicée par les variants génétiques associés à la maladie.

Un dernier exemple incontournable concerne l'approche Genome Wide Scan dans la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui a conduit à la mise en évidence des mutations du gène NOD2 en cause dans la maladie de Crohn (*Hugot JP et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature. 1996 Feb 29;379(6568):821-3*). *distribution: its use in the detection of linkage. Ann Hum Genet. 1978 Jul;42(1):87-94*).

La stratégie genome wide scan repose toujours sur la séquence: analyses de liaison puis clonage positionnel :

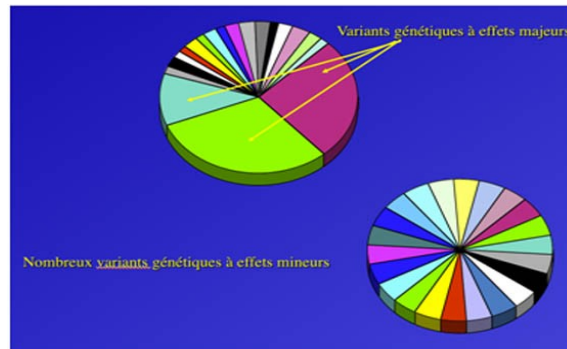
1°-identification de loci de susceptibilité par analyse de liaison génétique dans des familles,

2°-analyse de liaison avec des marqueurs plus rapprochés dans les loci précédemment identifiés ("fine mapping") pour restreindre la taille du locus de susceptibilité,

3°-puis analyse de gènes ou prédictions de gènes candidats positionnels, dont l'implication dans la maladie est validée ou écartée sur la base d'analyses d'association entre des variants génétiques et la maladie.

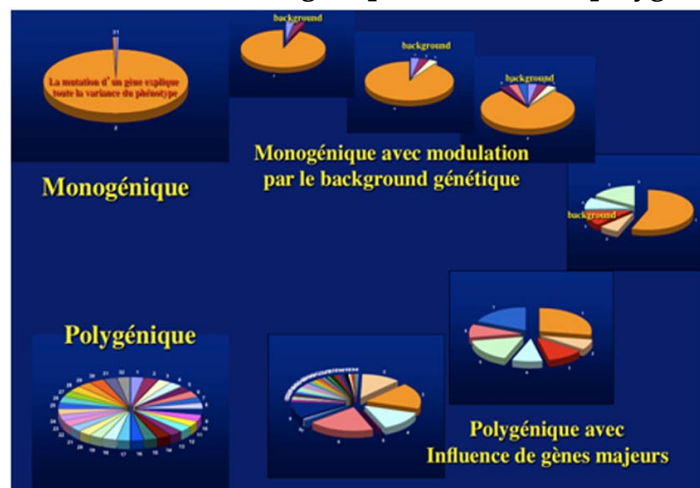
De ces études Genome Wide Scan on peut déjà avancer l'idée que certaines maladies multifactorielles auront une base génétique avec un ou des variants génétiques à effets majeurs (comme dans la maladie de Crohn) alors que pour d'autres maladies multifactorielles il sera question d'une multitude de variants génétiques ayant tous un effet mineur (comme cela semble être le cas pour le diabète de type 2 et l'obésité).

Figure 18 : Variants génétiques à effets mineurs - variants génétiques à effet majeurs



Par extension il faut admettre que la dichotomie sémantique entre maladies monogéniques et maladies polygéniques (multifactorielles) est finalement artificielle car entre la mutation d'un gène qui explique toute la variance du trait phénotypique dans une maladie monogénique et une affection multifactorielle dont la composante génétique résulte d'une myriade de variants génétiques à effets faibles il existe un continuum de situations qui expliquent les atteintes de sévérité variable en fonction du background génétique dans des maladies monogéniques et les maladies polygéniques avec l'effet d'un ou plusieurs gènes majeurs.

Figure 19 : Maladies monogéniques et maladies polygéniques



En effet il est rapporté de nombreux cas de variants génétiques qui modulent la sévérité d'une maladie monogénique comme par exemple dans la mucoviscidose (*Drumm ML et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. N Engl J Med 2005 353 pp 1509-1511; Arkwright PD et al. TGF beta 1 genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. Thorax 2000 55 446*).

VII.3 L'APPROCHE "GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY" (GWAS)

Le développement des technologies de séquençage et de génotypage à haut débit à partir des années 2000, basées sur les "puces à ADN" (*DNA chips*) a ouvert la voie à l'obtention rapide d'un très grand nombre de génotypes. Il est alors devenu envisageable de génotyper un grand nombre de marqueurs génétiques chez un grand nombre de sujets. Cette opportunité technologique a ouvert la voie au GWAS qui se résume à une étude d'association à très grande échelle: autant d'analyses d'association cas-témoin que de variants génétiques analysés. En effet la méthode consiste à génotyper un maximum de marqueurs génétiques (de 317 000 à 1 000 000 selon le type de puce à ADN) chez un grand nombre de sujets atteints de la maladie génétique "complexe" et un grand nombre de sujets témoins. Les variations d'un nucléotide (SNP, single nucleotide polymorphism) malgré leur nature bi-allélique qui contraste avec le caractère multi allélique des microsatellites, ont été retenues compte tenu de leur très grand nombre sur le génome humain offrant ainsi une très bonne couverture du génome. En effet les SNPs constituent les variants génétiques les plus fréquents. Par ailleurs leur nature bi allélique les rend plus accessibles au génotypage de masse au moyen des puces à ADN que les marqueurs microsatellites qui présentent un très grand nombre d'allèles. La méthode Genome Wide Scan qui s'intéressait à la co-transmission entre des régions du génome (repérées par les marqueurs microsatellites) et le phénotype "malade" ou "non malade", reposait donc sur la liaison génétique entre les marqueurs microsatellites et les loci en rapport avec la maladie "complexe". La méthode GWAS consiste en des études d'association entre un allèle donné d'un SNP et le phénotype "malade" ou "non malade." La méthode GWAS repose donc sur le déséquilibre de liaison génétique qui existe au sein du génome humain entre un allèle d'un marqueur génétique (SNP) et un variant génétique potentiellement impliqué dans la maladie "complexe". Un plus de la méthode est qu'elle permet de cribler le génome avec une haute densité de marqueurs: en effet pour une puce ADN 550K (qui génotype 550 000 SNPs) la densité moyenne est de un marqueur SNP tous les 60 kb.

Figure 20 :Single Nucleotide Polymorphism

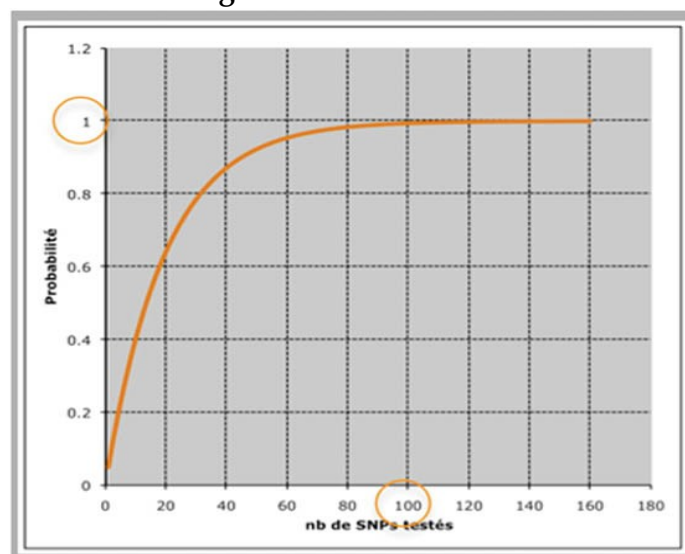


L'association mise à profit dans le GWAS est également fonction (1) de la distance entre le locus du marqueur génétique (SNP) analysé et le locus où réside le variant génétique de susceptibilité à la maladie (ce paramètre sera moins limitant compte tenu de la grande densité de marqueurs : un tous les 60kb pour une couverture de 550 000SNPs), (2) mais surtout sera fonction du déséquilibre de liaison génétique (LD pour « linkage disequilibrium ») qui existe entre un allèle donné du locus du marqueur SNP et l'allèle de susceptibilité au niveau du locus où réside le variant génétique de susceptibilité à la maladie. Comme le LD est variable d'une population et d'une ethnie à une autre, les approches GWAS devront prendre en compte cette spécificité et inclure des sujets homogènes quant au LD (*Salisbury BA et al. SNP and haplotype variation in the human genome. Mutat Res. 2003 May 15;526(1-2):53-61, Evans DM et al. A comparison of linkage disequilibrium patterns and estimated population recombination rates across multiple populations. Am J Hum Genet. 2005 Apr;76(4):681-7. Epub 2005 Feb 17*)

La méthode GWAS pourrait sembler "la" méthode définitive susceptible de repérer tous les déterminants génétiques d'une maladie, compte tenu de sa haute densité de couverture du génome. Néanmoins la méthode souffre d'un certain nombre de limites.

Comme elle se résume à une succession d'études d'association cas-témoin, l'association d'un SNP avec la maladie est testée comme habituellement, au risque statistique 5% (0.05). Une association sera réputée significative quand il n'y a que 5% de chances que cette affirmation soit fausse (ce qui somme toute laisse 95% de chances d'avoir raison). En d'autres termes il y a 5% de chances que l'association soit trouvée positive par hasard. Quand après avoir analysé deux SNPs, on évalue la probabilité que l'un d'entre eux soit associé par hasard, le risque n'est plus de 0.05 mais de 0.1. Il sera de 0.14 pour 3 SNPs....

Figure 21 : Méthode GWAS

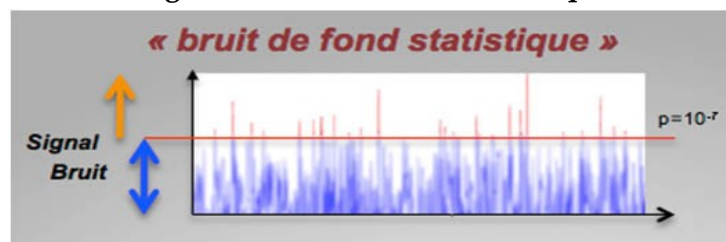


On voit qu'à partir d'une centaine de SNPs testés la probabilité que l'un d'entre eux soit associé à la maladie par hasard (calculée par la loi binomiale) est quasiment de 1. Une

méthode classique pour prendre en compte ce problème est de diminuer le seuil de significativité individuel de 0.05 à 0.025 dans le cas de deux SNPs. C'est le principe de la correction de Bonferoni. Mais à combien faut-il baisser le seuil de significativité individuel de chaque SNP pour que globalement une fois les 550 000 SNPs testés, le risque que l'un d'entre eux soit positif par hasard soit encore ≤ 0.05 ? Le calcul montre que si on teste chaque SNP au risque 0.0000001 (10^{-7}), la probabilité pour que l'un d'entre eux soit déclaré associé à la maladie par hasard est voisine de 0.05, ce qui devient statistiquement acceptable.

Il apparaît donc que seuls les SNPs présentant une association très fortement significative ($p \leq 10^{-7}$), pourront être considérés comme étant très vraisemblablement associés à la maladie et donc physiquement proches d'un déterminant génétique de la maladie. Une proximité qui sera fonction de la densité des marqueurs génétiques. La méthode GWAS aura donc tendance à ne pouvoir détecter que les effets génétiques importants. C'est un phénomène que l'on peut présenter comme un "bruit de fond statistique".

Figure 22 : Bruit de fond statistique



Une manière de contourner ce problème est de travailler sur des effectifs pléthoriques de patients et de témoins. En effet pour un même effet biologique ou physiologique testé, si la probabilité associée à la significativité du test statistique est de 0.05 avec 100 patients et 100 témoins elle peut être de 0.001 avec deux fois plus de sujets. C'est l'une des raisons pour laquelle il n'est pas rare que des protocoles GWAS incluent un grand nombre de sujets.

La méthode GWAS reste néanmoins une étude d'association qui implique qu'une détection ne sera possible seulement que si le déterminant génétique est en déséquilibre de liaison génétique avec le marqueur SNP génotypé. Par ailleurs les SNPs inclus dans les puces à ADN par les fabricants, ont été choisis parmi les SNPs « fréquents » en terme de fréquences alléliques pour des raisons de commodité technologique et d'ubiquité d'utilisation. La méthode repose donc implicitement sur le postulat « common disease - common variant » qui s'avère de moins en moins ubiquitaire (Pritchard JK, Cox NJ. *The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? Hum Mol Genet. 2002 Oct 1;11(20):2417-23*). L'hypothèse « common disease common variant » suppose que les maladies multifactorielles qui sont des maladies fréquentes, reposeraient sur une susceptibilité génétique résultant de variants génétiques fréquents en termes de fréquences

alléliques. La méthode GWAS présente donc la tendance à faire l'impasse sur les variants génétiques rares. Cependant il est manifeste que certains variants génétiques rares jouent un rôle non négligeable de la susceptibilité génétique dans les maladies multifactorielles. Par exemple pour la mutation Y111H du gène ADIPOQ la fréquence allélique du variant n'est que de 0.015 (variant rare) mais cette variation s'accompagne d'un sur-risque de diabète de type 2 avec un OR=7.85 (*Vasseur F et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. Hum Mol Genet. 2002 Oct 1;11(21):2607-14.*

Néanmoins la méthode GWAS a permis la mise en évidence de nombreux nouveaux variants génétiques de susceptibilité pour toutes les maladies multifactorielles et les divers QTLs analysés. Evidemment la méthode a retrouvé les associations antérieurement rapportées avec les méthodes antérieures comme par exemple les mutations du gène NOD2 dans la maladie de Crohn, les variants du gène APOE dans la maladie d'Alzheimer, les variants du gène PPARG dans le diabète de type 2. Une revue récente de 2010, répertoriait 49 gènes de susceptibilité au diabète de type 2, la plupart mis en évidence par GWAS (*Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? Ann N Y Acad Sci. 2010 Nov;1212:59-77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05838.x*). De même une étude de 2010 rapportait 71 loci de susceptibilité à la maladie de Crohn la plupart détectés au moyen de la méthode GWAS (*Franke et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1118-25*). On voit que la méthode a permis une avancée significative dans la mise en évidence des déterminants génétiques en cause dans les maladies multifactorielles.

En savoir plus: *Why do genome-wide scans fail?* (<http://www.genetic-future.com/2008/03/why-do-genome-wide-scans-fail.html>) Lango H Weedon MN *What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice?* *J Intern Med* 2008 vol. 263 (1) pp. 16-27. Manolio TA *Genomewide association studies and assessment of the risk of disease* *N Engl J Med* 2010 vol. 363 (2) pp. 166-76.

VII.4 LE "WHOLE EXOME SEQUENCING"

Malgré les avancées spectaculaires dans la connaissance des facteurs génétiques de susceptibilité aux maladies multifactorielles réalisées entre autres via les GWAS, pour une maladie donnée, l'ensemble des variants identifiés n'explique qu'une faible partie de la variance du phénotype (héritabilité). En moyenne dans les maladies multifactorielles à peine 10% de l'héritabilité est expliquée par les variants génétiques connus. La question est alors « sur quoi reposent les 90% manquants ? » et quelles méthodes d'investigation employer pour caractériser cette part manquante et ainsi expliquer 100% de l'héritabilité?

Une approche récente du problème repose sur une opportunité technologique. Partant du principe que les séquences codantes ne représentent qu'une faible partie du génome mais concentrent 85% des mutations potentiellement responsables des maladies, des méthodes permettant de "capturer" l'ensemble des séquences codantes ("Whole Exome") et d'en déterminer la séquence ("Whole Exome Sequencing") ont été développées (Choi M *et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):19096-101. Epub 2009 Oct 27*). Ces méthodes de "Whole Exome Sequencing" (WES) permettent d'identifier en théorie la quasi totalité des variations de séquences qui existent au niveau des séquences codantes entre des sujets atteints de la maladie multifactorielle et des sujets indemnes. On voit que cette approche WES est bien adaptée à la caractérisation des variants rares qui étaient un peu laissés pour compte par la méthode GWAS.

VIII EN FINIR AVEC L'HÉRITABILITÉ MANQUANTE ?

Même si le "Whole Exome Sequencing" doit dans un futur récent révéler de nombreux variants rares qui contribuent à l'héritabilité des maladies multifactorielles, il est vraisemblable qu'il subsistera encore une part d'héritabilité manquante.

Selon Evan Eichler (Eichler EE *et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. Nat Rev Genet. 2010 Jun;11(6):446-50*) l'héritabilité manquante résiderait dans les variants de « grande taille » (comparés aux SNPs) comme les délétions, duplications, inversions (copy number variations CNVs) qui sont communes dans les populations humaines et non accessibles par les approches classiques de génétique (GWAS, séquençage...).

En savoir plus: O'Donovan et al. Phenotypic variations on the theme of CNVs. Nat Genet 2008 vol. 40 (12) pp. 1392-3 Wellcome Trust Case Control Consortium Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. Nature 2010 464 pp 713-720

Selon Greg Gibson (Eichler EE *et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. Nat Rev Genet. 2010 Jun;11(6):446-50*), comme l'héritabilité est aussi la variance totale du phénotype en population à laquelle on déduit la variance environnementale, il est postulé que les individus partagent un environnement commun, ce qui n'est vraisemblablement pas le cas et constitue un postulat réducteur. Gibson suppose l'existence d'un « environnement caché » qui interagirait avec les variants génétiques biaisant ainsi notre estimation de l'héritabilité. De plus les interactions gène-environnement ne sont pas prises en compte dans les modèles de calcul de l'héritabilité et n'interviennent pas non plus dans les analyses des résultats de GWAS.

En savoir plus: Visscher PM et al. Heritability in the genomics era-concepts and misconceptions. Nat Rev Genet. 2008 Apr;9(4):255-66. Epub 2008 Mar 4

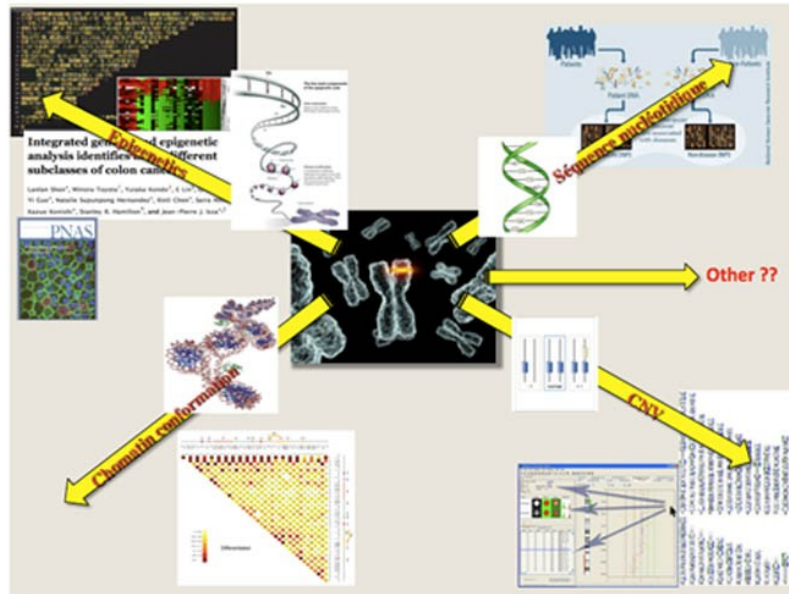
Selon Augustine Kong (*Eichler EE et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. Nat Rev Genet. 2010 Jun;11(6):446-50*) comme certains variants impliqués notamment dans les cancers et dans le diabète de type 2 se sont avérés « à risque » uniquement quand ils sont transmis par un parent donné (*Kong A et al. Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. Nature. 2009 Dec 17;462(7275):868-74*). En effet des variants « à risque » de diabète de type 2 devenaient « protecteurs » s'ils étaient transmis par l'autre parent. Ces phénomènes permettent de mieux cerner où se cache (une partie de) l'héritabilité manquante. D'une part ces variants sont délicats à mettre en évidence et leur contribution à l'héritabilité est forcément sous estimée si les modèles ne prennent pas en compte l'origine parentale. Un autre exemple concerne des variants génétiques qui augmentent la recombinaison génétique chez les pères et la réduisent chez les mères (*Kong A et al. Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate. Science. 2008 Mar 7;319(5868):1398-401. Epub 2008 Jan 31*), comme le taux de recombinaison parental affecte la transmission et que la recombinaison peut s'accompagner de mutations il est possible qu'il y ait alors une association qui repose aussi sur la nature du parent transmetteur. Dans le même registre les mécanismes d'empreinte parentale (épigénétique) ne sont pas pris en compte dans les approches GWAS et représentent aussi une part non négligeable de l'héritabilité manquante.

En savoir plus: HT Bjornsson Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. JAMA 2008 vol. 299 (24) pp. 2877-83. C Biéumont From genotype to phenotype. What do epigenetics and epigenomics tell us? Heredity 2010 105 pp 1-3. Gertz J et al. Analysis of DNA Methylation in a Three-Generation Family Reveals Widespread Genetic Influence on Epigenetic Regulation. Plos Genet 2011 7 e1002228.

Selon Jason Moore (*Eichler EE et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. Nat Rev Genet. 2010 Jun;11(6):446-50*) se référant aux micro-RNAs non codants qui sont un mécanisme nouveau de régulation génique, il faut conceptualiser l'héritabilité dans les maladies multifactorielles comme la résultante d'une superposition (juxtaposition ? interaction ?) de différentes couches de complexité. La première serait la variabilité de la structure primaire de l'ADN accessible par les méthodes habituelles (GWAS, séquençage), cependant des variants génétiques peuvent influencer ensuite l'expression de micro-RNAs ajoutant une nouvelle couche de complexité. Sur ces couches peuvent s'adjoindre d'autres couches de complexité comme l'épigénétique, les variations de recombinaison génétique en rapport avec des distorsions de transmission, les variations conformationnelles de la chromatine qui modulent aussi l'expression génétique. Ce concept que des variants génétiques multiples interagissent entre eux à travers plusieurs couches de complexité génomique est à mettre en perspective à ce que Bateson (*Bateson W, Mendel's*

principles of heredity ; Cambridge Univ. Press 1909 ; Bateson P, *William Bateson: a biologist ahead of his time* J Genet. 2002 Aug;81(2):49-58) dénomma en 1909 « epistasis » qui définissait les interactions entre les gènes, terme qui tend à prendre une définition plus large incluant les multiples interactions dans les systèmes biologiques complexes.

Figure 23 : Epistasis



IX CONCLUSIONS

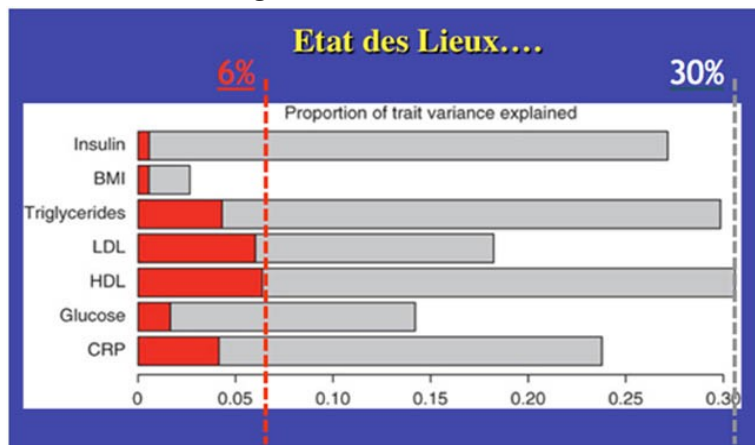
Dans un article de décembre 2008 (The genetic architecture of metabolic traits: a data explosion, (<http://m.wired.com/wiredscience/2008/12/the-genetic-architecture-of-metabolic-traits-a-data-explosion/>), Daniel Mc Arthur réagissait à propos d'articles publiés simultanément dans Nature Genetics concernant l'architecture génétique de traits phénotypiques et métaboliques. Deux papiers concernaient des GWAS sur le taux de glucose sanguin, un troisième rapportait des résultats de GWAS sur le diabète de type 2 et la sécrétion d'insuline; deux articles exploraient la dyslipidémie par GWAS, et un article explorait par GWAS les déterminants génétiques d'une dizaine de traits phénotypiques (triglycéridémie, HDL cholestérol, LDL cholestérol, glycémie, insulinémie, taux plasmatique de CRP, IMC, pression artérielle systolique et pression diastolique).

Prokopenko I et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels Nature Genetics 41, 77 - 81 (2008); Bouatia-Naji N et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk Nature Genetics 41, 89 - 94 (2008); Lyssenko V et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion Nature Genetics 41, 82 - 88 (2008); Kathiresan S et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia Nature Genetics 41, 56 - 65 (2008); Aulchenko YS et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts Nature Genetics 41, 47 - 55 (2008). Sabatti C et al. Genome-wide association analysis of metabolic traits in a

birth cohort from a founder population Nature Genetics 41, 35 - 46 (2008).

Daniel Mc Arthur mettait en relief le décalage entre la masse de variants génétiques révélés par ces études de grande ampleur et donc à priori impliqués dans l'héritabilité des traits, et la petite part de variance génétique expliquée par l'ensemble de ces variants génétiques. Par exemple l'une des études concernant 36610 sujets et la somme des variants détectés n'expliquait que 1.5% de la variance de la glycémie. Il remarquait aussi que deux études concernant la dyslipidémie et impliquant plus de 20000 sujets mettaient en relief un total de 18 loci dont un seul était commun aux deux études. La dernière étude (*Sabatti C et al.*), la plus petite en terme du nombre de sujets (n=4763), avait le grand avantage sur les autres de s'intéresser à une population homogène (toutes les personnes nées en 1966 dans deux des provinces du nord de la Finlande) et les auteurs, en plus de l'étude des déterminants génétiques par GWAS ont aussi évalué un certain nombre d'influences environnementales. Ce travail a l'avantage d'avoir permis de réaliser un état des lieux quant à ce que les données (de l'époque) permettaient de prédire tant du point de la part de variance génétique (héritabilité) que de la part de la variance environnementale. Les barres grises montrent la part de variance expliquée par les connaissances "actuelles" (variance génétique+variance environnementale), la part de variance génétique explicable par les variants génétiques connus est représentée par les barres rouges.

Figure 24 : Etat des lieux



On voit que dans le meilleur des cas, nos connaissances (génétiques et environnementales) actuelles ne permettent d'expliquer que 30% de la variance du HDL cholestérol, dont seulement 6% par les variants génétiques déjà identifiés. Pour les autres traits métaboliques la situation est bien moins avancée surtout en ce qui concerne la variance que la génétique (part d'héritabilité) est capable d'expliquer.

Ces résultats montrent que l'approche des maladies multifactorielles ne peut se dispenser d'inclure les variables "environnementales" dans les modèles d'analyse. Cette nécessité soulève de gros problèmes car contrairement à un génotypage de variant génétique, il est très difficile de recueillir de manière objective les variables environnementales (passées et présentes) d'un sujet donné. Par ailleurs ce recueil risque d'être toujours entaché d'une part

d'incertitude. On voit donc que les données récentes de la littérature pour stimulantes qu'elles soient invitent à une grande modestie quant à notre connaissance des déterminants d'une maladie multifactorielle et néanmoins ouvrent de vastes nouveaux champs d'investigation.

En savoir plus: Tishkoff S et al. Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading? Nat Rev Genet 2010 vol. 11 (10) pp. 723-33. Cordell HJ Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases Nature Reviews Genetics 2009 vol. 10 (6) pp. 392-404. (Sudmant PH Diversity of human copy number variation and multicopy genes. Science 2010 vol. 330 (6004) pp. 641-6. Mc Clellan J Genetic heterogeneity in human disease. Cell 2010 vol. 141 (2) pp. 210-7. Williams A et al. Interchromosomal association and gene regulation in trans. Trends Genet 2010 vol. 26 (4) pp. 188-97. Bogardus C Missing heritability and GWAS utility. Obesity 2009 vol. 17 (2) pp. 209-10.

X ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- Aulchenko YS et al. : Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts Nature Genetics 41, 47 - 55 (2008)
- B. Newman et al. : Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. Diabetologia 30 (1987), pp. 763-768.
- Bateson W : Mendel's principles of heredity ; Cambridge Univ. Press 1909 ; Bateson P, William Bateson: a biologist ahead of his time J Genet. 2002 Aug;81(2):49-58
- Billings LK, Florez JC. : The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? Ann N Y Acad Sci. 2010 Nov;1212:59-77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05838.x
- Bogardus C : Missing heritability and GWAS utility. Obesity 2009 vol. 17 (2) pp. 209-10.
- Bouatia-Naji N et al. : A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk Nature Genetics 41, 89 - 94 (2008)
- Boutin P et al. : GAD2 on chromosome 10p12 is a candidate gene for human obesity. PLoS Biol. 2003 Dec;1(3):E68. Epub 2003 Nov 3
- Bowden DW et al. : Molecular basis of a linkage peak: exome sequencing and family-based analysis identify a rare genetic variant in the ADIPOQ gene in the IRAS Family Study. Hum Mol Genet. 2010 Oct 15;19(20):4112-20. Epub 2010 Aug 5

- C Biémont : From genotype to phenotype. What do epigenetics and epigenomics tell us? *Heredity* 2010 105 pp 1-3
- Chen M, Cho J, Zhao H. : Incorporating biological pathways via a Markov random field model in genome-wide association studies. *PLoS Genet.* 2011 Apr;7(4):e1001353. Epub 2011 Apr 7
- Cheyssac C. et al. : EIF4A2 is a positional candidate gene at the 3q27 locus linked to type 2 diabetes in French families. *Diabetes.* 2006 Apr;55(4):1171-6.
- Choi M et al. : Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 10;106(45):19096-101. Epub 2009 Oct 27
- Cordell HJ : Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases *Nature Reviews Genetics* 2009 vol. 10 (6) pp. 392-404
- D. Chevenne, F. Trivin : Le diabète sucré : propositions de nouvelles normes de diagnostic et de classification. *Annales de Biologie Clinique.* Volume 56, Numéro 4, 463-70, Juillet - Août 1998, *Pratique quotidienne,*
- Deloukas P. et al. : The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome20. *Nature.* 2001-27;414(6866):865-71
- Delplanque J et al. : Linkage and association studies between the proopiomelanocortin (POMC) gene and obesity in caucasian families. *Diabetologia.* 2000 Dec;43(12):1554-7
- Delplanque J et al. : Mutation screening of the urocortin gene: identification of new single nucleotide polymorphisms and association studies with obesity in French Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Feb;87(2):867-9
- Demenais, F., Martinez, M., and Lathrop, M. (1996) : Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles. *Ann Instit Pasteur,* 7(1):3-12.
- Drumm ML et al. : Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005 353 pp 1509-1511; Arkwright PD et al. TGF beta 1 genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2000 55 446
- Economou M et al. : Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol.* 2004 Dec;99(12):2393-404
- Eichler EE et al. : Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010 Jun;11(6):446-50
- Eichler EE et al. : Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010 Jun;11(6):446-50

- Eichler EE et al. : Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010 Jun;11(6):446-50
- Eichler EE et al. : Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010 Jun;11(6):446-50
- Evans DM et al. : A comparison of linkage disequilibrium patterns and estimated population recombination rates across multiple populations. *Am J Hum Genet.* 2005 Apr;76(4):681-7. Epub 2005 Feb 17
- Feingold, J. (2005) : Maladies multifactorielles: un cauchemar pour le généticien. *Med Sci*, 11(21):927-33.
- Fisman PM et al. : A robust method for the detection of linkage in familial disease. *Am J Hum Genet.* 1978 May;30(3):308-21
- Franke et al. : Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1118-25
- Galli J et al. : Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet.* 1996 Jan;12(1):31-7.
- Gardner LI Jr, Stern MP, Haffner SM, Gaskill SP, Hazuda HP, Relethford JH, Eifler CW : Prevalence of diabetes in Mexican Americans. Relationship to percent of gene pool derived from native American sources
- Gertz J et al. : Analysis of DNA Methylation in a Three-Generation Family Reveals Widespread Genetic Influence on Epigenetic Regulation. *Plos Genet* 2011 7 e1002228.
- Guérardel A et al. : Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a Caucasian population. *BMC Genet.* 2005 Apr 11;6:19
- Hager J et al. : A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet.* 1998 Nov;20(3):304-8
- HT Bjornsson : Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 2008 vol. 299 (24) pp. 2877-83
- Hugot, J. P. et al. : Mutation screening in the CD19 and CD43 (sialophorin) genes in Crohn Disease patients. *Gastroenterology* 116, A740 1999
- Hugot JP et al. : Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature.* 1996 Feb 29;379(6568):821-3
- Kathiresan S et al. : Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia *Nature Genetics* 41, 56 - 65 (2008)

- Kong A et al. : Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature*. 2009 Dec 17;462(7275):868-74
- Kong A et al. : Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate. *Science*. 2008 Mar 7;319(5868):1398-401. Epub 2008 Jan 31
- Lango H Weedon MN : What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice? *J Intern Med* 2008 vol. 263 (1) pp. 16-27. Manolio TA Genomewide association studies and assessment of the risk of disease *N Engl J Med* 2010 vol. 363 (2) pp. 166-76.
- Liu et al. : Genome-wide interaction-based association analysis identified multiple new susceptibility Loci for common diseases., *PLoS Genet*. 2011 Mar;7(3):e1001338. Epub 2011 Mar 17
- Lyssenko V et al. : Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion *Nature Genetics* 41, 82 - 88 (2008)
- Mc Clellan J : Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 2010 vol. 141 (2) pp. 210-7.
- O'Donovan et al. : Phenotypic variations on the theme of CNVs. *Nat Genet* 2008 vol. 40 (12) pp. 1392-3 Wellcome Trust Case Control Consortium Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2010 464 pp 713-720
- Olavesen, M. G. et al. : Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene for association with inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 51, 1-7 2000
- Oostenbrug LE et al. : CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis*. 2006 Nov;38(11):834-45. Epub 2006 Aug 21
- Plomin R et al.. : Common disorders are quantitative traits. *Nature Reviews Genetics* 10, 872 (2009). doi:10.1038/nrg2670.
- Pritchard JK, Cox NJ : The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet*. 2002 Oct 1;11(20):2417-23
- Prokopenko I et al. : Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels *Nature Genetics* 41, 77 - 81 (2008)
- Roberts A, Thompson JS. : Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. *Adv Exp Med Biol*. 1976;67(00):313-327.

- Sabatti C et al. : Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population *Nature Genetics* 41, 35 - 46 (2008)
- Salisbury BA et al. : SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res.* 2003 May 15;526(1-2):53-61
- Siddiq A. et al. : A synonymous coding polymorphism in the alpha2-Heremans-schmid glycoprotein gene is associated with type 2 diabetes in French Caucasians. *Diabetes.* 2005 Aug;54(8):2477-81.
- Styrkarsdottir U et al. : Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol.* 2003 Dec;1(3):E69. Epub 2003 Nov 3
- Suarez BK et al : The generalized sib pair IBD distribution: its use in the detection of linkage. *Ann Hum Genet.* 1978 Jul;42(1):87-94
- Sudmant PH : Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 2010 vol. 330 (6004) pp. 641-6.
- Tishkoff S et al. : Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading? *Nat Rev Genet* 2010 vol. 11 (10) pp. 723-33
- TW Kurtz : The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension, *Hypertension*, vol. 13, no 6, 1989, p. 896-901.
- Vasseur F. et al. : Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 1;11(21):2607-14
- Vasseur F et al. : Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 1;11(21):2607-14
- Vionnet N et al. : Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 2000 Dec;67(6):1470-80
- Visscher PM et al. : Heritability in the genomics era-concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet.* 2008 Apr;9(4):255-66. Epub 2008 Mar 4
- Williams A et al. : Interchromosomal association and gene regulation in trans. *Trends Genet* 2010 vol. 26 (4) pp. 188-97.

Maladies mitochondriales

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Agnès Rötig, Marlène Rio, Arnold Munnich

INSERM U781, Université Paris Descartes

Service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Maladies mitochondriales.....	3
I.1 La chaîne respiratoire.....	3
I.2 Le déficit métabolique.....	3
I.3 Diagnostic enzymatique.....	4
I.4 IRM cérébrale.....	4
I.5 Présentations cliniques.....	4
I.6 Génétique.....	7
I.7 Traitement.....	10
I.8 Conseil génétique et Diagnostic prénatal.....	10

INTRODUCTION

Les maladies mitochondriales regroupent une grande variété de pathologies dont le dénominateur commun est un déficit de la chaîne respiratoire (CR) mitochondriale. La chaîne respiratoire a pour rôle essentiel la synthèse d'ATP nécessaire à toutes les cellules de l'organisme. Cette synthèse se fait à partir de cinq complexes multi-enzymatiques localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Le rôle central des mitochondries et la complexité de leur organisation, faisant intervenir de multiples enzymes et plusieurs centaines de gènes, expliquent la sévérité et la grande fréquence des maladies mitochondriales parmi les maladies métaboliques. Ces maladies sont sûrement les plus fréquentes des maladies métaboliques avec une incidence de 1/5000 naissances.

I MALADIES MITOCHONDRIALES

I.1 LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

La phosphorylation oxydative a lieu au niveau de la chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale interne. Elle fait intervenir d'une part des réactions d'oxydation qui aboutissent à une consommation d'oxygène, d'autre part une réaction de phosphorylation de l'ADP intramitochondrial en ATP. La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes multi-enzymatiques qui fonctionnent comme transporteurs d'électrons : le complexe I (plus de quarante sous-unités), le complexe II (quatre sous-unités), le complexe III (onze sous-unités) et le complexe IV (treize sous-unités). Enfin, le complexe V, ou ATPase (quatorze sous-unités), assure la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique dans la matrice mitochondriale.

I.2 LE DÉFICIT MÉTABOLIQUE

Un déficit enzymatique de la chaîne respiratoire provoque une modification profonde des équilibres d'oxydoréduction cytoplasmiques et mitochondriaux, par accumulation d'équivalents réduits (NADH, FADH). Dans la mitochondrie, cette accumulation de NADH pousse à la transformation de l'acétoacétate en 3-hydroxybutyrate entraînant une élévation du rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate. De la même façon, dans le cytoplasme, la transformation du pyruvate en lactate est favorisée et le rapport lactate/pyruvate s'élève avec une augmentation secondaire de la concentration en lactate. L'existence d'une hyperlactacidémie persistante et d'une perturbation des équilibres redox représente une indication formelle d'une exploration enzymologique de la chaîne respiratoire.

I.3 DIAGNOSTIC ENZYMATIQUE

L'activité de la chaîne respiratoire est estimée par deux techniques, la polarographie et la spectrophotométrie. Les études polarographiques permettent de mesurer la consommation d'oxygène par des fractions enrichies en mitochondries. Ces études sont réalisées sur des préparations enrichies en mitochondries à partir de petites biopsies musculaires (100-200 mg de muscle). Les études polarographiques se font à partir de matériel frais. Les études spectrophotométriques permettent de mesurer les activités des complexes de la chaîne respiratoire seuls ou par groupe en utilisant des donneurs ou des accepteurs d'électrons spécifiques. Elles sont réalisées sur des biopsies de petite taille (muscle, foie, rein, myocarde) immédiatement congelées et maintenues en permanence dans l'azote liquide (ou au pire à -80°C).

Le tissu à étudier doit être dans la mesure du possible le tissu cliniquement atteint. Cependant, quand des organes d'accès difficile sont touchés les investigations ne pourront se faire que sur des tissus périphériques (muscle squelettique, lymphocytes, fibroblastes). Quel que soit l'organe atteint, il est essentiel de prélever une biopsie de peau des patients (même en post-mortem immédiat) pour de futures investigations enzymologiques ou moléculaires sur fibroblastes en culture. En effet, de cette étude sur fibroblastes en culture dépendra la possibilité d'un futur diagnostic prénatal pour les grossesses suivantes. Il faut cependant rappeler que dans la moitié des cas environ les déficits de la chaîne respiratoire ne s'expriment pas dans les fibroblastes.

I.4 IRM CÉRÉBRALE

L'apport de l'IRM cérébrale est de plus en plus important pour le diagnostic de maladie mitochondriale et permet parfois d'orienter le diagnostic génétique. C'est particulièrement le cas pour les déficits isolés en complexe I qui montrent des anomalies du tronc cérébral et des noyaux gris ainsi qu'un pic de lactate.

I.5 PRÉSENTATIONS CLINIQUES

De par la fonction ubiquitaire des mitochondries une maladie mitochondriale doit être évoquée chez des patients présentant (1) une association inexplicée de signes neuromusculaires et non neuromusculaires, (2) une évolution rapidement progressive, (3) associant des organes a priori sans relation. La maladie peut avoir un début prénatal, néonatal, dans l'enfance, l'adolescence ou l'âge adulte. Les symptômes les plus fréquemment observés sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Symptômes les plus fréquemment observés dans les maladies mitochondriales

<i>Période néonatale (0-1 mois)</i>	
SNC	Apnées itératives, léthargie, somnolence, mort subite "récupérée" Hypotonie axiale et périphérique Acidose lactique congénitale Coma acidocétosique
Muscle	Macroglossie Myopathie Atrophie musculaire, hypotonie Rigidité, hypertonie Myoglobinuries récurrentes Mauvaise tenue de tête, peu de mouvements spontanés
Foie	Insuffisance hépatique, hépatomégalie
Coeur	Cardiomyopathie hypertrophique
Rein	Tubulopathie proximale (syndrome de De Toni-Debré-Fanconi)
<i>Enfance (1 mois-2 ans)</i>	
SNC	Apnées récurrentes, mort subite "récupérée" Coma acidocétosique Mauvaise tenue de tête, spasticité des membres Régression psychomotrice, retard mental Ataxie cérébelleuse "Stroke-like" Myoclonies, convulsions généralisées Encéphalomyopathie nécrosante (syndrome de Leigh) Poliodystrophie infantile progressive (syndrome d'Alpers)
Muscle	Myopathie Atrophie musculaire Faiblesse musculaire hypotonie Myalgies, intolorance à l'effort Myoglobinuries récurrentes
Foie	Hépatomégalie progressive Insuffisance hépatocellulaire

	Insuffisance hépatique induite par le Valproate
Coeur	Cardiomyopathie hypertrophique
Rein	Tubulopathie proximale (syndrome de De Toni-Debré-Fanconi) Néphropathie tubulointerstitielle (mimant une néphronophtise) Syndrome néphrotique Insuffisance rénale Syndrome urémique hémolytique
Intestin	Vomissement récurrents Diarrhée chronique, atrophie villositaire Insuffisance pancréatique exocrine Retard de croissance Pseudo-obstruction intestinale chronique
Système endocrinien	Petite taille, retard de maturation squelettique Hypoglycémies récurrentes Déficit hormonal multiple
Moelle	Anémie sidéroblastique Neutropénie, thrombopénie Syndrome myélodysplasique, syndrome dysérythropoïétique
Oeil	Surdité Surdité neurosensorielle
Oreille	Atrophie optique Diplopie Ophtalmoplégie externe progressive Rétinopathie "sel et poivre", rétinite pigmentaire Ptosis de la paup�re Cataracte
Peau	Pigmentation anormale des zones expos�es au soleil Trichothiodystrophie Cheveux secs, épais et cassants
<i>Enfance (>2 ans) et âge adulte</i>	
SNC	Myoclonies Convulsions (g�n�ralis�es, focales, photosensibles, toniclonies)

	<p>Ataxie cérébelleuse</p> <p>Spasticité</p> <p>Régression psychomotrice, retard mental, démence</p> <p>"Stroke-like"</p> <p>Mal de tête hémicranial, migraine</p> <p>Hemiparesies récurrentes, cécité corticale, hémianopsie</p> <p>Leucodystrophie, atrophie corticale</p> <p>Neuropathie périphérique</p>
Muscle	<p>Myopathie progressive</p> <p>Faiblesse musculaire proximale</p> <p>Myalgies, intolérance à l'effort</p> <p>Myoglobinuries récurrentes</p>
Coeur	<p>Cardiomyopathie concentrique hypertrophique ou dilatée</p> <p>Bloc Atrio-Ventriculaire</p>
Système endocrinien	<p>Diabète (insulino et non-insulino dépendant)</p> <p>Déficit en hormone de croissance</p> <p>Hypoparathyroïdisme</p> <p>Hypothyroïdisme</p> <p>Déficit en adrénocorticotrophine</p> <p>Hyperaldostéronisme</p> <p>Infertilité (insuffisance ovarienne ou dysfonction hypothalamique)</p>
Oeil	<p>Ptosis de la paupière</p> <p>Diplopie</p> <p>Ophthalmoplégie externe progressive</p> <p>Rétinopathie "sel et poivre", rétinite pigmentaire</p> <p>Cataracte, opacités cornéales</p> <p>Neuropathie optique de Leber</p>
Oreille	<p>Surdité neurosensorielle</p> <p>Surdité induite par les aminoglycosides (transmission maternelle)</p>

I.6 GÉNÉTIQUE

La mitochondrie possède son propre ADN, l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui code pour 13 protéines de la CR, deux ARN ribosomiaux (ARNr) 12S et 16S et 22 ARN de transfert (ARNt). Toutes les autres protéines de la CR et celles impliquées dans son assemblage et le maintien de l'ADNmt sont codées par des gènes nucléaires. Ainsi tous les modes de transmission sont possibles dans les maladies mitochondriales, autosomique récessif ou

dominant, lié à l'X, maternel et beaucoup de cas sporadiques.

Les mutations de l'ADNmt sont en général hétéroplasmiques car il y a coexistence de molécules normales et mutées dans une même cellule ou un même tissu, les tissus les plus atteints ayant un fort taux de mutation. Les mutations ponctuelles de l'ADNmt sont le plus souvent à transmission maternelle alors que les délétions se retrouvent en général dans des cas sporadiques. Les principales mutations et délétions de l'ADNmt ainsi que les présentations cliniques associées sont présentées dans le **Tableau 2**.

Les mutations de gènes nucléaires représentent sûrement la cause la plus importante de maladies mitochondriales, surtout chez l'enfant. Du fait du très grand nombre de gènes nucléaires impliqués dans les fonctions mitochondriales et de la grande hétérogénéité clinique et génétique des maladies mitochondriales ces mutations sont relativement difficiles à identifier. Ces gènes sont impliqués dans l'assemblage des complexes de la CR, la synthèse de cofacteurs de la CR tels que l'ubiquinone, la synthèse des protéines codées par l'ADNmt, la réplication de l'ADNmt, la fusion et la fission du réseau mitochondrial. Les principales mutations de gènes nucléaires ainsi que les présentations cliniques associées sont présentées dans le **Tableau 3**.

Tableau 2. Principales mutations et délétions de l'ADNmt et présentations cliniques associées

Déficit	Gène	Fonction	Clinique	Mode de transmission
Complexe I	ND3, ND4, ND5 (ADNmt)	sous-unité du CI	Syndrome de Leigh	mitochondrial
Complexe V	ATP6 (ADNmt)	sous-unité du CV	NARP/syndrome de Leigh	mitochondrial
Multiple	ARNtLeu (ADNmt) ARNtLys (ADNmt) délétion de l'ADNmt	ARNt ARNt	MELAS MERRF KSS/Pearson syndrome	mitochondrial mitochondrial sporadique
	ND4, ND6, cytb	sous-unités de la CR	Neuropathie optique de Leber	mitochondrial

Tableau 3. Principales mutations de gènes nucléaires et présentations cliniques associées

Déficit	Gène	Fonction	Clinique	Mode de trans.
Complexe I	NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA11 NDUFAF2, NDUFAF1, C6ORF66, C8ORF38, C20ORF7, ACAD9	sous-unités du CI	Syndrome de Leigh	AR
		assemblage du CI	Syndrome de Leigh	AR
Complexe II	SDHA SDHB, SDHC, SDHD	sous-unité du CII	Syndrome de Leigh	AR
		sous-unités du CII	Paragangliome/phéochromocytome	AD
Complexe III	BCS1	assemblage du CIII	Tubulopathie/ encephalopathie/ défaillance hépatique	AR
Complexe IV	SURF-1 SCO2	assemblage du CIV	Syndrome de Leigh	AR
		assemblage du CIV	Cardioencéphalomyopathie	AR
Multiple	TP (thymidine phosphorylase)	synthèse des	MNGIE	AR
	POLG1 (ADN polymerase),	nucléotides	Atteinte hépatique/ Alpers	AR
	Twinkle (hélicase)	réplication de	+ déplétion ADNmt	AR
	TK2, DGUOK	l'ADNmt	Myopathie/atteinte	AR
	MPV17	synthèse des	hépatique + déplétion	AR
	PUS1	nucléotides inconnue	ADNmt	AR
	TRMU	traduction	Atteinte hépatique +	AR
	DARS2	mitochondriale	déplétion ADNmt	AR
	Frataxine	traduction	Anémie	
		mitochondriale	sidéroblastique+myopathie	
	traduction	Atteinte hépatique		
	mitochondriale	Leucoencéphalopathie		
	synthèse des protéines	Ataxie de Friedreich		
	à centre Fe-S			
	AFG3L2 (Paraplegine)	Contrôle qualité des protéines	Paraplégie spastique	AR

POLG1 (ADN polymerase), Twinkle (hélicase) OPA1 TAZ (Tafazzin)	réplication de l'ADNmt fusion des mitochondries synthèse des cardiolipines	Ophthalmoplégie + délétion ADNmt Atrophie optique Syndrome de Barth	AD AD lié à l'X
---	---	--	-----------------------

I.7 TRAITEMENT

Il n'y a actuellement pas de thérapie des maladies mitochondriales. Le traitement est essentiellement symptomatique et ne modifie pas de façon significative l'évolution de la maladie. Il s'agit de compléter par des cofacteurs (ubiquinone pour les déficits en ubiquinone), de recommandation diététique (régime riche en lipides et pauvre en sucres) et d'éviter des médicaments connus pour avoir un effet délétère (valproate qui précipite la défaillance hépatique dans les syndromes d'Alpers par exemple). Du fait de l'implication progressive d'organes dans l'évolution de ces maladies la greffe d'organe est rarement évoquée.

I.8 CONSEIL GÉNÉTIQUE ET DIAGNOSTIC PRÉNATAL

Le diagnostic prénatal (DPN) des maladies mitochondriales est dans la grande majorité des cas une tâche difficile et problématique. La possibilité d'un diagnostic prénatal se présente uniquement pour des familles dans lesquelles il y a eu un cas index chez qui le diagnostic d'une maladie mitochondriale a été établi formellement par identification de la mutation en cause.

Les remaniements de grande taille de l'ADNmt, délétions ou duplications partielles, se retrouvent dans la grande majorité des cas de façon sporadique. Le conseil génétique peut donc être *a priori* rassurant.

Les mutations ponctuelles de l'ADNmt (syndromes MELAS, MERRF, NARP et l'atrophie optique de Leber) sont presque toujours à l'état hétéroplasmique, sont transmises selon un mode maternel et dans la grande majorité des cas sont retrouvées chez les mères et certains apparentés maternels des patients. Une analyse fine de l'arbre généalogique de la famille a pour objectif d'identifier des signes cliniques mineurs chez les apparentés. La recherche de la mutation trouvée chez le cas princeps va ensuite permettre d'identifier les individus porteurs de cette mutation. Il n'y a aucun risque pour la descendance d'un homme porteur d'une mutation ponctuelle. En revanche, le risque est élevé pour la descendance et la fratrie d'une femme porteuse d'une mutation de l'ADNmt. Dans ce cas, il est possible de proposer un DPN moléculaire pour la prévention d'une récurrence de la maladie. Cependant, il est toujours très difficile de se prononcer dans ce type de DPN. En effet, la proportion de

molécules d'ADNmt mutées dans les villosités chorales ne permet pas d'estimer sa proportion dans d'autres tissus fœtaux, ni son évolution au cours du développement embryonnaire. La présence de moins de 20% ou plus de 80% de molécules mutées chez le fœtus est respectivement de bon et de mauvais pronostic *a priori*. En revanche, des résultats intermédiaires sont extrêmement difficiles à interpréter

Si une mutation d'un gène nucléaire a été identifiée chez le cas princeps il est possible de proposer un DPN moléculaire comme pour n'importe quelle autre maladie génétique autosomique récessive, dominante ou liée à l'X selon les cas.

Prédispositions génétiques aux cancers : actualités et perspectives en 2010

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

D Stoppa-Lyonnet,

Service de Génétique et Unité INSERM U830, Institut Curie, 75248 Paris cedex 5 ; Université Paris Descartes 75270 Paris cedex 6

MH Stern,

Unité INSERM U830 et Service de Génétique, Institut Curie, 75248 Paris cedex 5

N Soufir,

Laboratoire de Biochimie Hormonale et Génétique, Hôpital Bichat Claude Bernard, APHP ; Université Paris VII ; Centre de Recherche sur la Peau, Hôpital saint Louis, 75010, Paris

G Lenoir,

Service de Génétique, Institut Gustave Roussy, 94805 ; Université Paris XI, Orsay 91405

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Introduction.....	3
II Les prédispositions aux cancers identifiées en 2010.....	5
III Le diagnostic de prédisposition aux cancers en 2010.....	7
NOTE(S) DU CHAPITRE	10
IV Vers l'identification de nouveaux gènes de prédisposition et de gènes de susceptibilité.....	11
V Conclusion et Perspectives.....	12
VI Annexes.....	14

Article paru dans Pathologie-Biologie 58 :324-30, 210

Résumé

Les études conduites au cours de ces 30 dernières années ont constitué un apport majeur pour la compréhension de la transformation tumorale. Elles ont ouvert un domaine nouveau de la génétique : l'étude des prédispositions aux cancers. Aujourd'hui, les situations les plus simples de prédisposition ont été identifiées : monogénique, risque tumoral élevé, phénotypes associés. Plus de 70 gènes ont été identifiés et une grande partie d'entre eux font l'objet de tests génétiques. L'indication des tests, la prise en charge en aval des sujets à risque doivent être réfléchies de façon collégiale. Les efforts sont à poursuivre pour identifier les facteurs génétiques et non génétiques modificateurs des risques tumoraux. C'est ouvrir le domaine de l'étude des facteurs de susceptibilité pour les premiers et celui des interactions gène-environnement pour les seconds. La combinaison de facteurs de susceptibilité associés à des risques plus faibles (certains pouvant être des facteurs modificateurs évoqués plus haut) et dont la combinaison et/ou l'interaction avec des facteurs d'environnement pourrait conduire à des risques individuels élevés (prédisposition multifactorielle).

Enfin, un nouveau domaine s'ouvre : celui de la part constitutionnelle de l'hôte dans le pronostic tumoral et dans la réponse aux traitements.

Summary

Studies performed during these last thirty years have had a major impact on the understanding of carcinogenesis. They have opened a new field: cancer genetic predisposition. At the present time, most of the cancer predispositions linked to the alteration of one gene, associated with a high risk of cancer and with a specific phenotype

have been identified. About 70 genes have been identified and have led to genetic testing. The indication of genetic testing, the management of at risk patients require the establishment of guidelines. The next challenge is the identification of cancer susceptibility genes associated with low risk or modifying the effect of treatment.

Mots clés : gène de prédisposition aux cancers, gène de susceptibilité aux cancers, , oncogène, gène suppresseur de tumeur, INCa

Key Words: hereditary cancer gene, cancer susceptibility gene, oncogene, tumor suppressor gene, French National Cancer Institute

I INTRODUCTION

Le cancer est une maladie génétique de la cellule. C'est un dogme que les trente dernières années de recherche n'ont cessé de vérifier [1], [2] et [3] pour revue. En effet, le caractère tumoral d'une cellule est héritable et transmissible aux cellules filles par des modifications génétiques ou épigénétiques du génome. La transformation tumorale est un processus le plus souvent d'origine clonal, dans lequel la cellule acquière au fur et mesure des divisions successives un avantage sélectif par rapport à ses congénères (survie, prolifération, indépendance aux facteurs de croissance, etc). Ces étapes sont acquises par des altérations très variées du génome (mutations ponctuelles, délétions, translocations, gains ou pertes de chromosomes, modifications épigénétiques). Ces altérations génétiques ont deux conséquences bien différentes. Elles peuvent conduire à l'augmentation de l'activité de certains gènes favorisant au sens large la croissance tumorale ; ces gènes sont appelés oncogènes. A l'inverse, elles peuvent inactiver d'autres gènes dont l'activité physiologique s'oppose à la transformation tumorale, d'où leur nom de gènes suppresseurs de tumeurs. [4]. Au niveau de la cellule tumorale, les oncogènes ont une action dominante : l'activation d'un seul allèle est généralement suffisante à sa contribution au phénotype tumoral ; à l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont récessifs : l'inactivation des deux allèles est nécessaire. Il faut cependant nuancer ces notions, car d'une part la réduction d'activité de certains gènes suppresseurs, par exemple par haploinsuffisance, suffit parfois à conférer un avantage sélectif vers la malignité. D'autre part, certaines mutations de gènes suppresseurs de tumeurs ont une action dominante, tout en inhibant la fonction du gène (action dominante négative). L'exemple le plus classique est le gène *TP53* dont des mutations inactivatrices conduisent à stabiliser la protéine mutante et inhiber de façon dominante le complexe transcriptionnel tétramérique P53 [5].

La majorité de ces mutations et remaniements de l'ADN sont acquis et transmis lors de la division cellulaire. Des données épidémiologiques et expérimentales permettent d'estimer qu'une dizaine d'évènements géniques sont nécessaires aux développements des carcinomes [2], [4]. La coïncidence d'autant d'anomalies génétiques dans une même cellule est incompatible avec notre estimation du taux d'erreur dans le génome humain par mitose

[6]. L'acquisition du phénotype tumoral est donc intimement liée à l'augmentation de l'instabilité génétique qu'elle soit d'origine extrinsèque par exposition à des agents physiques ou chimiques ou d'origine intrinsèque par anomalies des très nombreuses voies de métabolisme des mutagènes et de réparation du génome.

Une grande partie de la recherche actuelle a pour objectif d'identifier dans les différents cancers les gènes mutés ou dont l'expression est modifiée. L'identification récente de centaines de milliers de variations génétiques nucléotidiques dispersées sur l'ensemble du génome (SNP : Single Nucleotide Polymorphism) et de régions dont le nombre de répétitions est variable dans la population (CNV : copy number variation) associée au développement de technologies d'analyse haut débit permettant l'étude de plus de 500 000 SNPs et de CNV sur une puce d'un cm² et la nouvelle génération de séquenceurs d'ADN (NGS) permettent d'avoir une vision exhaustive et sans hypothèses a priori de l'ensemble des modifications des cellules tumorales. L'une des difficultés de l'analyse de ces masses de données est cependant de repérer les mutations qui ont un impact sur le processus tumoral parmi les mutations dites « passager », simples témoins de l'exposition de la cellule aux agents mutagènes et aux erreurs de réplication de l'ADN [4]. En 2010, plus de 400 gènes impliqués dans l'oncogenèse ont été recensés par le Sanger Center dans le cadre du projet Cancer Genome Project. [7], (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>).

La plupart des mutations sont acquises (somatiques) au cours de la transformation tumorale. Cependant, certaines sont présentes dès la conception (mutations constitutionnelles, ou encore germinales) et expliquent les prédispositions génétiques aux cancers. Ces mutations germinales touchent le plus souvent les gènes suppresseurs de tumeurs, et comme on le verra parfois, certains oncogènes. Elles peuvent également toucher les gènes de surveillance/réparation de l'ADN, augmentant l'instabilité génétique cellulaire. En augmentant de façon aléatoire le nombre de mutations, le risque de mutation dans des gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs augmente et, par là, la probabilité de voir émerger un processus tumoral.

La notion de prédisposition génétique au(x) cancer(s) est une notion relative. Elle correspond à une augmentation du risque de cancers ou d'un cancer donné d'une personne mesurée par rapport au risque moyen de la population générale ou plus précisément par rapport aux personnes non porteuses d'un marqueur génétique donné. Il s'agit de la mesure d'un risque relatif. Autrement dit, si on revient au processus biologique de la transformation cellulaire, il s'agit de situations où le quota de mutations nécessaires à la transformation cellulaire est atteint plus rapidement par rapport à la moyenne générale. Ainsi lorsqu'une mutation d'un gène clé du processus tumoral est constitutionnelle, une étape est déjà franchie. L'archétype en est la prédisposition au rétinoblastome : l'inactivation des deux allèles du gène RB1 est nécessaire (mais pas suffisante) à la transformation tumorale des neuroblastes de la rétine du jeune enfant. Dans plus de 60%

des cas, l'atteinte est unilatérale et survient après l'âge de 12 mois. Dans la plupart de ces cas, les deux mutations ont été acquises. En revanche, dans près de 40% des cas, l'atteinte est bilatérale et survient avant l'âge de 12 mois et dans près de 10% des cas (25% des cas bilatéraux) l'un des deux parents a été atteint dans l'enfance. Chez ces enfants, l'une des deux mutations du gène *RB1* est constitutionnelle, l'autre est somatique. Cette hypothèse développée par Knudson et complétée par Comings, a été confirmée avec l'identification du gène *RB1* en 1986 par Friend [1,8] [9]. Il faut souligner que ce type de prédisposition aux cancers obéit à une transmission familiale dominante alors que l'action de ces gènes est récessive au niveau cellulaire.

II LES PRÉDISPOSITIONS AUX CANCERS IDENTIFIÉES EN 2010

En près de 25 ans, plus de 70 gènes de prédisposition aux cancers ont été identifiés (tableau 1 : <http://umvf.univ-nantes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique10/site/html/>) et <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>).

Ils correspondent dans leur majorité aux situations de prédisposition les plus simples à mettre en évidence, la partie émergée d'un iceberg que représenterait l'ensemble des prédispositions aux cancers. Il s'agit de prédispositions transmises selon un modèle mendélien, dominant ou récessif, et associées à un risque tumoral souvent élevé. En effet, il s'agit soit (1) de prédispositions transmises selon le mode dominant et associées à un risque tumoral élevé et conduisant alors souvent à une concentration familiale de cancers, soit (2) de syndromes dont les manifestations désignent la prédisposition. Les archétypes de ces maladies en sont les hamartomatoses et les maladies cassantes des chromosomes.

Les gènes de ces deux groupes de prédisposition ont été identifiés dans la majorité des cas par des études de liaison génétique puis clonage positionnel, ou parfois par des approches gènes candidats. L'un des grands succès des approches de liaison est l'identification des gènes de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire, *BRCA1* et *BRCA2*. Les études d'épidémiologie génétique ont examiné la répartition des cancers du sein et les âges au diagnostic dans les familles de femmes atteintes de cancer du sein. Ces études ont retenu un modèle dominant avec des valeurs de fréquence génique et de pénétrance [10]. La réunion d'une trentaine de familles sélectionnées et la prise en compte ces études a permis à Mary-Claire King en 1990 de localiser *BRCA1* en 17q21 [11]. Puis, dans le cadre d'un consortium de laboratoires, la position du gène recherché a pu être finement précisée et a conduit à son identification [12], [13]. Un succès très élégant de l'approche gène-candidat est l'identification des gènes *hMLH1*, *hMSH2* et *hMSH6* dont les altérations sont associées à un risque élevé de cancer du côlon et de l'endomètre. En effet, alors qu'étaient recherchées par une approche de perte d'hétérozygotie des régions du génome perdues de façon récurrente dans des adénocarcinomes du côlon de personnes s'inscrivant dans un syndrome de Lynch,

régions qui auraient alors été candidates pour abriter le ou les gènes responsables, il a été mis en évidence dans ces tumeurs non pas des pertes d'allèle mais l'apparition de néo-allèles, évoquant un défaut de réparation d'erreurs de réplication de l'ADN (phénotype MSI, ou *MicroSatellite Instability*). Ces néo-allèles étaient très semblables à ce qui était observé chez certaines bactéries. Les homologues humains des gènes altérés chez ces bactéries, en l'occurrence *hMLH1*, *hMSH2* et *hMSH6*, ont été identifiés et des mutations constitutionnelles de ces gènes mises en évidence (pour revue [14]).

Certains gènes de prédisposition aux cancers sont des gènes impliqués dans le développement de l'embryon et du fœtus. Les mêmes mutations conduisent à la fois à une anomalie du développement et à un risque de cancer. Parfois il s'agit de mutations activatrices dans un cas et inactivatrices dans l'autre (mutations activatrices de *RET* et néoplasies endocriniennes de type 2 ; mutations inactivatrices et maladie de Hirschsprung) [15] ; parfois il s'agit de la même mutation (mutations *HRAS*, risque de rhabdomyosarcome et syndrome de Costello)[16]. Des mutations constitutionnelles activatrices d'oncogènes "puissants" en tests *in vitro*, comme *HRAS*, sont ainsi - et de façon surprenante - viables. Cela souligne que la transformation tumorale est liée à de multiples événements génétiques. Des mutations dans différents gènes d'une même voie de transduction du signal mitotique (gènes *PTCH*, *SUFU*, *GLI3* dont les mutations inactivatrices sont impliquées respectivement dans le syndrome de Gorlin conjuguant épithélioma basocellulaires et risque de médulloblastome, médulloblastome, syndromes de Greig et de Pallister-Hall caractérisés par des anomalies du développement cérébral et des syndactylies) (pour revues, [17]). De la même façon, les gènes de la cascade des TGF- β sont impliqués à la fois dans des anomalies vasculaires et des tumeurs digestives [18]. Une autre voie passionnante mérite d'être mentionnée : celle du facteur HIF-1 (Hypoxemia Induced Factor-1). Il s'agit d'un gène clé de l'induction de l'angiogénèse en réponse à l'hypoxie, et dont l'expression est finement régulée par différents gènes dont le gène *VHL* à l'origine de la maladie de von Hippel Lindau. D'autres gènes du cycle de Krebs (le *redox* conditionnant l'activation de HIF-1) ont été récemment impliqués dans les prédispositions aux cancers : gènes des sous-unités de la succinate déshydrogénase, gène de la fumarate hydratase (FH) dont les altérations monoalléliques sont associées respectivement à un risque de paragangliome et de cancer du rein. A l'état homozygote (biallélique) ou hétérozygote composite (deux mutations monoalléliques différentes et en trans), ces altérations sont responsables d'anomalies graves du métabolisme et de troubles neurologiques (pour revue [19]).

Jusqu'à l'identification des gènes *hMLH1* et *hMSH2* dans le syndrome de Lynch, on pensait que les prédispositions aux cancers associées à une anomalie de la réparation de l'ADN ne concernaient que des enfants atteints de maladies rares transmises selon le mode récessif et caractérisées le plus souvent par des anomalies chromosomiques acquises et spécifiques. Il s'agit principalement de l'ataxie télangiectasie, de la maladie de Fanconi et du syndrome de Bloom. Aujourd'hui, on peut retenir qu'avec les prédispositions aux cancers du côlon dans

le cadre du syndrome de Lynch ainsi que dans le cadre de la polypose atténuée liée aux mutations bi-alléliques de *MYH* et les prédispositions aux cancers du sein et de l'ovaire avec les mutations *BRCA1* et *BRCA2*, la majorité des formes héréditaires de cancers sont liées à des anomalies de réparation de l'ADN.

Il est difficile de faire une présentation synthétique et exhaustive de l'ensemble des prédispositions aux cancers identifiées en 2010 : faut-il retenir une présentation par gène, par type de mutation (activatrices, inactivatrices), par la voie cellulaire dans laquelle il est impliqué, par le mode de transmission de la prédisposition (dominant, récessif), par maladie prédisposante, par localisation tumorale. Les connaissances récentes viennent compliquer toute tentative de présentation simple : en effet, les mêmes gènes peuvent conduire à des pathologies bien différentes selon que les altérations constitutionnelles sont mono ou bi-alléliques. L'archétype est représenté par les altérations de *BRCA2* à l'origine d'un risque élevé de cancer du sein en cas d'altération mono-allélique ou d'une maladie de Fanconi en cas d'altération bi-allélique [20]. De la même façon, des altérations bi-alléliques des gènes *hMSH2* et *hMLH1* sont à l'origine de risque de tumeurs cérébrales et d'hémopathies extrêmement évolutives et sont donc loin du tableau familial classique du syndrome HNPCC associé à une altération mono-allélique [21]. De plus, l'appartenance à la catégorie gène suppresseur de tumeur ou à celle des gènes de stabilité du génome n'est plus exclusive. A titre d'exemple : le gène *APC* est impliqué dans la voie Wnt de transduction du signal mitogène et dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose [22].

Nous avons choisi une présentation par groupe de gènes (gènes suppresseurs de tumeur, gènes oncogènes, gènes de stabilité du génome). Nous avons mentionné le caractère dominant ou récessif de la prédisposition. Nous nous sommes largement inspirés du tableau de la revue de Vogelstein et Kinzler [3] que nous avons complété avec les données publiées sur le site du Cancer Genome Project (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>). On peut se référer pour une présentation plus clinique à l'article de revue de Garber et Offit [23] et enfin à la deuxième édition du memento du Journal of National Cancer Institute sur les prédispositions aux cancers [24].

Reprenant la métaphore de l'iceberg, il est clair que l'essentiel des facteurs de prédisposition aux cancers, constitué par sa partie immergée, n'est pas identifié. Les dix ou vingt prochaines années du développement de l'oncogénétique seront celles de la compréhension des situations de prédispositions complexes, car multigéniques et faisant intervenir l'environnement. Nous en discuterons au § 4.

III LE DIAGNOSTIC DE PRÉDISPOSITION AUX CANCERS EN 2010

Les prédispositions aux cancers qui font l'objet de tests génétiques diagnostiques sont celles pour lesquelles les risques tumoraux ont été établis, la prise en charge des risques définie, prise en charge qui a pour finalité une diminution de la morbidité et de la mortalité. La prise en charge est dans la majorité des cas une surveillance précoce et rapprochée, conduite en milieu spécialisé. Cependant, dans certains cas, une prévention chirurgicale est recommandée : colectomie en cas de polypose adénomateuse clinique, annexectomie dès l'âge de 40 ans en cas d'altération du gène *BRCA1* par exemple. Les efforts de recherche portent sur le développement de molécules ayant un effet préventif. Notons l'essai clinique LIBER de prévention du cancer du sein, proposé aux femmes ménopausées porteuses d'une altération des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, essai qui examine l'effet préventif d'inhibiteurs de l'aromatase, classe d'anti-œstrogènes. Les principaux gènes qui font l'objet d'un test génétique en pratique clinique sont cités dans le **tableau 2** et dans le rapport d'activité en oncogénétique édité annuellement par l'INCa, Institut National du Cancer, (<http://www.e-cancer.fr/les-soins/oncogenetique>).

Tableau 2 : Nombre de tests cas index réalisés en 2007

Gène	Nbre de test	Gène	Nbre de test	Gène	Nbre de test
BRCA1	4183	TP53	165	ATM	35
BRCA2	4114	PTCH	156	SMAD4	25
MSH2	948	RB1	116	FH	19
MLH1	900	PTEN	106	INI1	19
MYH	671	NF2	96	MET	16
RET	449	HRPT2	80	BMPR1A	15
MSH6	437	BHD	79	WRN	13
MEN1	408	FANCA	69	RUNX1	12
APC	389	AIP	69	FANCG	9
VHL	386	PMS2	64	NBN	6
SDHB	342	CDH1	53	CYLD	5

SDHD	319	XPC	50	MRE11	4
CDK4	262	STK11	47	XPB	4
CDKN2A	262	CDKN1B(P27,KIP1)	44	BLM	2
NF1	258	PRKAR1	42		
SDHC	169	XPA	37		

Ce tableau est une adaptation du tableau publié dans le « Rapport sur l'estimation des besoins de la population pour les 10 années à venir en termes d'accès aux consultations et aux tests d'oncogénétique » (<http://www.e-cancer.fr/les-soins/oncogenetique>).

L'ensemble des gènes étudiés en 2007 en pratique diagnostique dans les laboratoires français est rapporté. Ils sont présentés en ordre décroissant du nombre de tests réalisés. Dans l'ensemble, il correspondent au nombre de prescriptions faites en 2007. Cependant, dans certains cas (FANCA, AIP), le nombre, élevé, est lié à la mise en place récente du test et à l'analyse de cas dont l'enregistrement est ancien.

Les éléments évocateurs d'une prédisposition génétique sont : le jeune âge au diagnostic (par rapport à l'âge moyen de l'atteinte dans la population), la multiplicité des lésions tumorales, la présence d'une histoire familiale du même cancer ou d'autres cancers associés à la prédisposition et l'existence éventuelle d'une maladie associée. Pour les cancers fréquents (sein, côlon), l'histoire familiale est un élément important d'orientation. En général, est retenue comme évocatrice d'une prédisposition l'existence de trois cas unis entre eux par un lien de premier ou second degré et appartenant à la même branche parentale ou de deux cas mais dont un cas survenant à un âge jeune par rapport à la tumeur considérée. On verra cependant quelques lignes plus loin que l'histoire familiale n'est pas le seul élément d'orientation.

Du fait de la grande diversité des mutations, en règle différentes d'une famille à l'autre, et surtout du fait qu'une mutation clairement délétère n'est pas toujours identifiée, les tests sont conduits en deux temps : (1) analyse d'un cas index, (2) analyse des apparentés si une mutation a été identifiée. Le cas index est en général une personne qui a été traitée pour un cancer donné et à un âge précoce. Si à l'issue de l'analyse, aucune mutation n'a été identifiée, le test est considéré comme peu informatif, car on ne peut exclure l'existence d'un facteur de prédisposition (mutation dans le gène étudié et non détectée ou d'un gène non étudié). De plus, aucun test ciblé ne peut être proposé aux apparentés. En revanche, si une mutation a été identifiée, alors un test peut être réalisé chez ces derniers. Si celui-ci est négatif, on peut retenir que l'apparenté testé n'a pas hérité du facteur familial de prédisposition.

Si la sélection d'une personne atteinte et ayant une histoire familiale de cancer du sein et de l'ovaire correspondant aux critères évoqués plus haut permet de multiplier par 100 la probabilité d'identifier une mutation d'un gène *BRCA1/21* (*cf.note : BRCA1/2*), la sensibilité des critères familiaux n'est que de 50% [25]. En effet, en cas de transmission paternelle dans une famille de petite taille et du fait de la pénétrance incomplète, les antécédents familiaux peuvent être absents. C'est ainsi et compte-tenu d'une fréquence des mutations *BRCA1/2* dans les cas de cancer de l'ovaire estimée à 10% que l'une des conclusions du rapport 2009 de l'INCa portant sur les besoins dans les 10 ans à venir en oncogénétique, a été de proposer un test *BRCA1/2* à toute femme ayant été atteinte d'un cancer de l'ovaire avant l'âge de 70 ans (<http://www.e-cancer.fr/les-soins/oncogenetique>).

La mise en évidence d'une signature tumorale d'une prédisposition permettrait de s'affranchir d'une indication des tests génétiques fondée sur l'histoire familiale et l'histoire clinique. Dans le cadre du syndrome de Lynch dont le spectre tumoral large concerne le côlon, l'intestin grêle, l'endomètre, l'urothélium, l'estomac, les voies biliaires et l'ovaire, la recherche du phénotype tumoral MSI (voir §1) devant l'un de ces cancers survenant avant l'âge de 60 ans est un élément d'orientation essentiel.

Avec une fréquence de femmes prédisposées aux cancers du côlon et aux cancers du sein de l'ordre de 1/250 et d'hommes prédisposés aux cancers du côlon de l'ordre de 1/500 (tableau 1), les prédispositions aux cancers fréquents² (*cf.note : cancers fréquents*) obéissant à un modèle monogénique dominant sont parmi les maladies génétiques les plus fréquentes. Les consultations de génétique et les tests réalisés sont en plein essor. Grâce à un programme de soutien de la DHOS (Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins) relayée par l'INCa, le nombre de tests de prédisposition aux cancers a été en 2003 de 12 256 et en 2007 de 20 035, soit une progression de 63% (tableau 2) (<http://www.e-cancer.fr/les-soins/oncogenetique>). Ce programme s'est attaché à intégrer analyses de laboratoire, consultations de génétique et prise en charge multidisciplinaire des personnes à haut risque. Il favorise également une activité de réseaux entre les praticiens, ceci afin d'homogénéiser les pratiques sur l'ensemble du territoire. Les mesures de prévention des cancers du sein et du côlon ont fait l'objet de recommandations [26,27] et sont résumées sur le site de l'INCa. En dehors de la définition des bonnes pratiques des tests, le réseau de laboratoires doit relever un défi : la classification des variants génétiques (mutations faux-sens, suspicion d'anomalie d'épissage) dont la signification biologique est inconnue. En effet, jusqu'à 40% des mutations identifiées dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* et tout autant pour les gènes de prédisposition aux cancers du côlon sont des variants de signification inconnue (Bendboudjema et al, en préparation). Un effort non seulement national mais aussi international, *via* la création du consortium ENIGMA, est fait pour les classer et par là pour prendre en charge les familles de façon la plus adaptée possible.

NOTE(S) DU CHAPITRE

BRCA1/2 : La fréquence des porteurs de mutations *BRCA1* et *BRCA2* dans la population est estimée à 1/500. Aujourd'hui, une mutation de l'un de ces gènes est identifiée dans environ 20% (1/5) des cas index testés selon les critères fondés sur l'histoire familiale, évoqués plus haut. Ainsi, ces critères permettent de multiplier par 100 la probabilité de trouver une mutation.

cancers fréquents : Prédisposition aux cancers du sein, et du côlon. On met à part pour l'instant les prédispositions au cancer de la prostate dont le ou les gènes responsables n'ont pas été définitivement identifiés.

IV VERS L'IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GÈNES DE PRÉDISPOSITION ET DE GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ

Aujourd'hui, une grande partie des formes familiales de cancers fréquents (sein, côlon) n'est pas expliquée par la transmission de l'allèle muté d'un gène déjà identifié. Les études d'épidémiologie génétique réalisées à partir de cas familiaux de cancer du sein sans mutation identifiée, suggèrent l'existence de modes de transmission récessifs et/ou oligogéniques [28]. L'identification des gènes, ou plutôt variants alléliques, responsables passera par des études d'association puissantes et/ou des études de liaison non paramétriques (paires de germains atteints). Ces études reposeront sur la constitution de groupes de patients et de témoins judicieusement sélectionnés et par de très nombreux génotypages [29,30]. Les allèles responsables peuvent être des mutations rares et associés à des risques relatifs de 2 à 4 et non seulement de 10 comme ceux associés aux mutations *BRCA1/2*. La mise en évidence de ces mutations rares dans des gènes candidats mais aussi dans des gènes analysés sans hypothèse *a priori* devrait bénéficier des nouvelles générations de séquenceur. Les allèles peuvent être également, sans que cela soit exclusif, des allèles fréquents dans la population générale, c'est-à-dire des polymorphismes dont des SNPs, voire des CNV. Les premières études d'association génome-entier sont apparues en 2007. Elles ont permis d'identifier un certain nombre de variants alléliques fréquents (dont la fréquence dans la population est de 5 à 50%). De plus ces variants peuvent être directement causals ou une partie d'entre eux seulement peuvent être génétiquement liés à un autre variant qui lui est causal. Citons à titre d'exemple l'étude du groupe de Bruce Ponder sur les cancers du sein. Six variants alléliques (il s'agissait de l'allèle rare de chaque SNP, système à deux allèles) dont la localisation est le plus souvent dans une région non codante, voire pas même dans un gène, ont été identifiés : *FGFR2* (fibroblast growth factor 2), deux variants sur le gène *TNRC9* ou *TOX3* (facteur de transcription), *MAP3K1* (Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1), *LSP1* (lymphocyte-specific protein codant pour une protéine d'interaction de l'actine F) et un variant allélique sur le bras long du chromosome 8

[31]. Les risques relatifs sont très faibles : de 1,06 à 1,63 mais ceci de façon très significative. Rappelons à titre de comparaison que le risque relatif d'une femme dont la mère ou la sœur a été atteinte de cancer du sein est de 2. Alors que la validité scientifique de ces résultats est solide, leur utilité clinique aujourd'hui est nulle, soulignant combien il faut rester prudent sur le transfert trop rapide vers la pratique clinique de ces connaissances. Il n'en demeure pas moins qu'il est indispensable de poursuivre les recherches et d'examiner les interactions entre ces variants génétiques, les gènes majeurs de prédisposition déjà identifiés et les facteurs environnementaux de risque [32]. Il est intéressant de noter que certains des six variants cités plus haut sont des facteurs modificateurs du risque de cancer du sein chez les femmes porteuses d'une mutation *BRCA2* [33]. De plus, sous réserve de la mise en évidence de leur caractère causal, l'identification de ces variant devrait aussi ouvrir de nouvelles pistes sur la compréhension des mécanismes de cancérogénèse et par là sur le traitement de ces tumeurs et leur prévention. Soulignons que le rôle des protéines *BRCA1* et *BRCA2* dans la réparation des altérations de l'ADN a conduit Alan Ashworth à faire l'hypothèse que la majoration du déficit de réparation pouvait augmenter la sensibilité tumorale à la radio et à la chimiothérapie, introduisant ainsi le concept de « synthetic lethality ». L'administration d'un inhibiteur de la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (*PARP1*) chez des femmes atteintes de cancer du sein ou de l'ovaire dans un contexte *BRCA1/2* est très encourageante [34].

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'essentiel des gènes de prédisposition aux cancers obéissant à un modèle mendélien dominant ont été identifiés, d'autres associés à des prédispositions au déterminisme plus complexe, seront identifiés sans aucun doute dans les prochaines années.

Néanmoins, il reste pour les premiers gènes identifiés encore bien des questions à résoudre. Pourquoi, alors qu'un gène a une expression ubiquitaire, son altération est-elle associée à un risque tumoral tissu-spécifique ? L'archétype en est la prédisposition au rétinoblastome. Alors que la protéine RB a un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la différenciation en contrôlant l'activité de plusieurs facteurs de transcription de la famille E2F, son absence a un effet tumoral limité à la fois dans l'espace et dans le temps : les neuroblastes de la rétine de l'enfant de moins de deux ans principalement. Une autre question concerne les gènes dont l'altération transmise selon le mode dominant nécessite une inactivation somatique du second allèle. Existe-t-il une haploinsuffisance dans les cellules non tumorales des personnes mutées ? La réponse à cette question est très importante pour les gènes de stabilité du génome. En effet, si l'altération d'un seul allèle *BRCA1* ou *BRCA2* est associée à un défaut de réparation de l'ADN, alors on peut craindre un effet mutagène plus important des rayons X utilisés pour la surveillance mammaire.

Enfin, nous n'avons évoqué dans cet article que les gènes associés à une augmentation du risque de survenue d'un cancer. Il faut s'interroger maintenant sur l'existence de

déterminants génétiques constitutionnels influençant (1) la réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie, (2) le processus métastatique. En effet, on peut se demander sur ces deux points quelle est la part des variations génétiques constitutionnelles. En d'autres termes, réponses aux traitements et processus métastatique pourraient ne pas être inscrits dans le seul génome tumoral mais aussi dans celui de l'hôte. Une étude récente a montré que le taux de survie d'une femme atteinte de cancer du sein était lié à celui de sa sœur atteinte [35]. Un premier variant localisé dans un gène de réparation des altérations cellulaires oxydatives a été identifié [36]. De la même façon, un variant allélique de la chemokine CX3CR1 est associé de façon significative à une augmentation de la survie chez des patients atteints de glioblastome [37]. L'exploration de ces variants génétiques de curabilité de cancer ne fait cependant que commencer et appartient encore au domaine de la recherche. De la même façon, s'ouvre l'ère de la pharmacogénétique. Il a été montré que la diminution de l'expression du cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) était liée à une moindre efficacité du tamoxifène, anti-œstrogène majeur utilisé dans le traitement de certains cancers du sein [38]. L'identification de ces facteurs génétiques est un grand défi. Leurs recherches reposeront en partie sur la constitution de banques de tumeurs ayant des annotations cliniques et associées à la conservation d'ADN constitutionnel. L'enjeu est de proposer un traitement individuel le plus adapté possible.

L'établissement des risques associés et la définition de la prise en charge, prise en charge acceptable par les personnes concernées, restera une condition *sine qua non* pour établir la validité clinique de tout test génétique. Il importe de rappeler les principes qui doivent sous-tendre la réalisation de test génétique : non discrimination, non stigmatisation, nécessité d'une information complète, respect de l'expression de la volonté de la personne.

Cet article est une mise à jour de l'article parue dans Médecine/Sciences en 2005, 21: 962-8.

VI ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Comings DE (1973) : A general theory of carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 70: 3324-3328.
- (10) Claus EB, Risch N, Thompson WD (1991) : Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. Am J Hum Genet 48: 232-242.
- (11) Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, et al. (1990) : Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 250: 1684-1689.
- (12) Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP (1993) : Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 52: 678-701.
- (13) Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, et al. (1994) : A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266: 66-71.
- (14) de la Chapelle A (2004) : Genetic predisposition to colorectal cancer. Nat Rev Cancer 4: 769-780.
- (15) Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, et al. (2008) : Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. J Med Genet 45: 1-14.
- (16) Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y (2008) : The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. Hum Mutat 29: 992-1006.
- (17) Pasca di Magliano M, Hebrok M (2003) : Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. Nat Rev Cancer 3: 903-911.
- (18) Waite KA, Eng C (2003) : From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. Nat Rev Genet 4: 763-773.
- (19) Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA (2003) : A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. Nat Rev Cancer 3: 193-202.
- (2) Nowell PC (1976) : The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194: 23-28.

- (20) Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, et al. (2002) : Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297: 606-609.
- (21) Bougeard G, Charbonnier F, Moerman A, Martin C, Ruchoux MM, et al. (2003) : Early onset brain tumor and lymphoma in MSH2-deficient children. *Am J Hum Genet* 72: 213-216.
- (22) Fodde R, Smits R, Clevers H (2001) : APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 55-67.
- (23) Garber JE, Offit K (2005) : Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 23: 276-292.
- (24) Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH (2008) : Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 1-93.
- (25) Bonaiti-Pellie C, Andrieu N, Arveux P, Bonadona V, Buecher B, et al. (2009) : [Cancer genetics: estimation of the needs of the population in France for the next ten years]. *Bull Cancer* 96: 875-900.
- (26) Eisinger F, Bressac B, Castaigne D, Cottu PH, Lansac J, et al. (2004) : Identification et prise en charge des prédispositions héréditaires aux cancers du sein et de l'ovaire (mise à jour 2004)]. *Bull Cancer* 91: 219-237.
- (27) Olschwang S, Bonaiti C, Feingold J, Frebourg T, Grandjouan S, et al. (2004) : Identification et prise en charge du syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colon cancer), et des prédispositions héréditaires aux cancers du côlon et de l'endomètre. *Bull Cancer* 91: 303-315.
- (28) Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, et al. (2001) : Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet Epidemiol* 21: 1-18.
- (29) Houlston RS, Peto J (2004) : The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene* 23: 6471-6476.
- (3) Vogelstein B, Kinzler KW (2004) : Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-799.
- (30) Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF (2004) : Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* 4: 850-860.
- (31) Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, et al. (2007) : Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447: 1087-1093.

- (32) Andrieu N, Goldstein AM (2004) : The case-combined-control design was efficient in detecting gene-environment interactions. *J Clin Epidemiol* 57: 662-671.
- (33) Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, et al. (2008) : Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 82: 937-948.
- (34) Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, et al. (2009) : Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361: 123-134.
- (35) Hartman M, Lindstrom L, Dickman PW, Adami HO, Hall P, et al. (2007) : Is breast cancer prognosis inherited? *Breast Cancer Res* 9: R39.
- (36) Udler M, Maia AT, Cebrian A, Brown C, Greenberg D, et al. (2007) : Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 3015-3023.
- (37) Rodero M, Marie Y, Coudert M, Blondet E, Mokhtari K, et al. (2008) : Polymorphism in the microglial cell-mobilizing CX3CR1 gene is associated with survival in patients with glioblastoma. *J Clin Oncol* 26: 5957-5964.
- (38) Hoskins JM, Carey LA, McLeod HL (2009) : CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 576-586.
- (4) Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, et al. (2006) : The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268-274.
- (5) Ko LJ, Prives C (1996) : p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10: 1054-1072.
- (6) Loeb LA (2001) : A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61: 3230-3239.
- (7) Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, et al. (2004) : A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4: 177-183.
- (8) Knudson AG, Jr. (1971) : Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823.
- (9) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, et al. (1986) : A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-646.

Le dépistage néonatal

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

M. Roussey

Professeur de Pédiatrie. Université de Rennes I

Président de l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de
l'Enfant (AFDPHE)

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Les critères d'un DNN.....	3
II Les maladies bénéficiant actuellement d'un programme de DNN en France	4
III L'organisation pratique du DNN en France.....	5
IV Les perspectives.....	6
V Annexes.....	8

L'histoire du dépistage néonatal (DNN) systématique, à partir de taches de sang séché sur papier buvard, remonte à 1963 avec la mise au point du test permettant de dépister la phénylcétonurie (PCU), « **le test de Guthrie** », réalisé à trois jours de vie. Ce test permet de doser la phénylalanine (PHE) dans le sang et donc son élévation, toxique pour le développement cérébral de l'enfant. La PCU, maladie héréditaire, de transmission autosomique récessive, devenait ainsi la première arriération mentale évitable grâce à l'établissement précoce d'un régime spécifique pauvre en PHE à un stade pré-symptomatique, permettant à des enfants de rester normaux. Le concept de DNN au moyen de gouttes de sang était né.

Le dépistage néonatal (DNN) a donc été introduit en France il y a plus de 40 ans à la suite de la découverte de Guthrie et depuis d'autres dépistages sur ce papier buvard dit de « Guthrie » ont pu être mis en place progressivement dans la plupart des pays développés.

Le DNN consiste donc à identifier parmi tous les nouveau-nés ceux qui sont susceptibles d'être atteints d'une maladie qui, bénéficiant d'un diagnostic précoce, auront accès à un traitement efficace pouvant modifier le cours de l'évolution de leur maladie avant que n'apparaissent des lésions irréversibles.

I LES CRITÈRES D'UN DNN

Les programmes de DNN sont variables selon les pays mais la France a constamment visé 3 objectifs :

- « l'**égalité** avec un accès identique de tous les nouveau-nés aux tests de dépistage et à la prise en charge thérapeutique : Métropole, Collectivités d'Outre-Mer (COM), Départements et Régions d'Outre-Mer (DROM) et Pays d'Outre-Mer (POM ex-TOM) (Polynésie, Nouvelle-Calédonie).
- « l'**efficacité** », avec la recherche d'une sensibilité et d'une spécificité maximales limitant les possibilités de faux négatifs (enfants malades non dépistés) et de faux positifs (enfants dépistés mais non malades) ; et
- surtout « l'**utilité** », avec en priorité le bénéfice direct pour l'individu malade. Autrement dit, le programme ne vise que des affections dont le diagnostic précoce engendre une amélioration directe de la qualité de vie du malade. En cela, le programme français est en adéquation avec les critères de dépistage en population générale, dits **critères de Wilson et Jungner**, édités par l'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 pré-symptomatique ;
5. la confirmation du dépistage par des méthodes de certitude est obligatoire ;
6. le test 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.

Plusieurs conférences de consensus ont repris ultérieurement ces différents critères mais sans en modifier les principes fondamentaux originels ; ont ainsi été précisés l'exhaustivité, la nécessité d'une information suffisante des familles, une confidentialité des résultats individuels, une prévalence suffisante de la maladie dépistée, un recueil simple de l'échantillon biologique nécessaire (test simple et reproductible), et toujours en insistant sur le fait que tout dépistage devait apporter un réel bénéfice pour le nouveau-né lui-même [2]. Bien que le consentement parental explicite ne soit pas nécessaire pour le dépistage des nouveau-nés effectué dans le cadre d'une action de santé publique, les différents programmes mis en place soulignent toutefois la nécessité d'éduquer le public et d'avoir en place un système qui informe adéquatement les parents sur leur choix de ne pas participer

au programme de DNN et des conséquences possibles qui sont associées à cette option. En France, c'est pratiquement 100 % des nouveau-nés qui bénéficient d'un tel dépistage, alors qu'en fait celui-ci n'est pas obligatoire pour les familles, mais les professionnels ont l'obligation de le proposer [3].

Cependant, des entorses relatives à ces critères de DNN sont apparues du fait des progrès technologiques (biologie moléculaire, spectrométrie de masse), des acquisitions médicales (par exemple, amélioration de la prise en charge des enfants atteints de mucoviscidose), voire de la demande des populations. De ce fait, la liste des maladies pouvant être dès maintenant dépistées en période néonatale devient techniquement très importante et doit être sans cesse mise à jour. Chaque nouveau dépistage doit faire l'objet d'une évaluation scientifique et médico-économique, notamment par la Haute Autorité de Santé (HAS), avant d'être validé par l'Agence de Biomédecine et décidé en dernier ressort par le Ministre de la Santé.

II LES MALADIES BÉNÉFICIAINT ACTUELLEMENT D'UN PROGRAMME DE DNN EN FRANCE

En 2011, 5 maladies (dont 4 génétiques de transmission autosomique récessive) font l'objet d'un DNN en France, avec par ordre chronologique d'introduction :

- la *PCU* en 1972, avec le dosage de la *phénylalanine* ;
- l' *hypothyroïdie congénitale* (HC) (maladie sporadique) en 1978, avec le dosage de la **TSH** ; de ce fait le marqueur ne repère que les hypothyroïdies d'origine basse (ectopie thyroïdienne, athyréose, troubles de l'hormonogénèse), très largement majoritaires chez le nouveau-né ;
- la *drépanocytose* en 1989 dans les DROM en population générale puis en 1995 en métropole pour une population ciblée originaire de pays à forte incidence, avec recherche d'une hémoglobine S (**HbS**) lors d'une électrophorèse de l'hémoglobine ; en fait d'autres anomalies de l'hémoglobine, telle que la thalassémie par exemple, sont aussi repérées par cet examen ;
- l' *hyperplasie congénitale des surrénales* (HCS) par déficit en 21 hydroxylase, en 1995, avec le dosage de la **17 hydroxyprogestérone** (17OHP) ;
- la *mucoviscidose* en 2002, avec le dosage de la **trypsine immunoréactive** (TIR) et, en cas d'élévation, recherche des principales mutations du gène de la maladie sur le même prélèvement mais avec le recueil préalable de l'accord écrit des parents (toute recherche génétique nécessite l'accord écrit du patient et pour le nouveau-né de ses parents).

L'instauration du DNN a permis d'avoir des données épidémiologiques sur ces 5 maladies. Près de 30 millions de nouveau-nés ont ainsi bénéficié de ce dépistage avec plus de 16 000 malades repérés avec des différences d'incidence nettes selon les maladies.

Ainsi l'incidence est de 1 pour 16 000 naissances pour la PCU, 1/3 500 pour l'HC, 1/18 000 pour l'HCS, 1/700 pour la drépanocytose (population générale en DROM-COM et population ciblée en métropole), et 1/4 600 pour la mucoviscidose. La drépanocytose est devenue la 1ère des maladies dépistées en terme de fréquence puisque, même rapportée à l'ensemble de la population générale en métropole, le chiffre est de 1/2 400 en 2010 [4]. Il est probable qu'une généralisation de ce dépistage en métropole ait lieu prochainement, d'autant qu'un ciblage ethnique n'est pas conforme aux principes républicains.

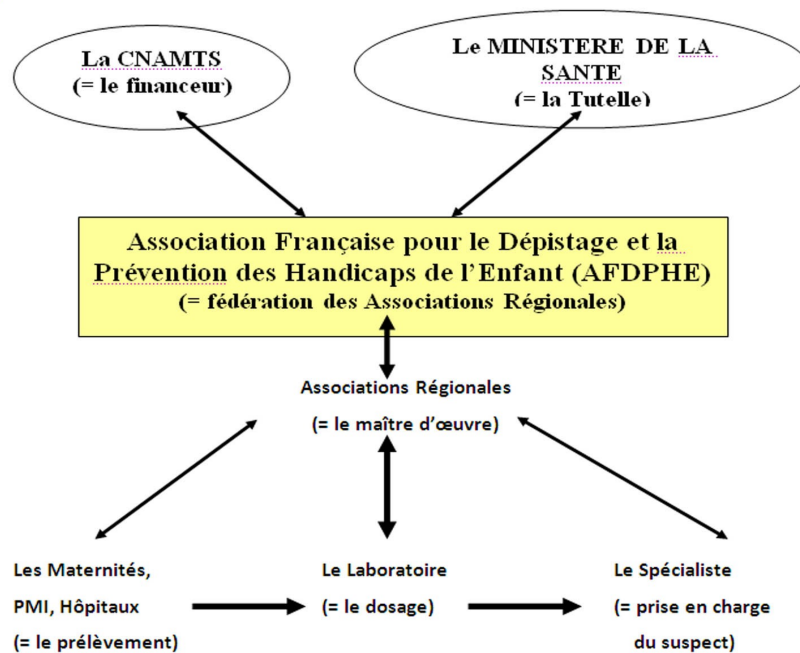
III L'ORGANISATION PRATIQUE DU DNN EN FRANCE

L'organisation du DNN 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 du programme de DNN. Elle est confiée à une association nationale, l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) qui est en fait une fédération d'associations régionales (AR) correspondant aux régions administratives. Cette décentralisation est nécessaire afin d'être au plus près des maternités où a lieu le prélèvement de sang (a priori au talon au moyen d'une lancette) à chaque bébé à **J3 soit après 72 heures de vie**. Quelques gouttes de sang sont ainsi recueillies sur un papier buvard spécial qui va pouvoir être adressé **quotidiennement** par courrier postal dans une enveloppe T au laboratoire de l'AR afin d'avoir un résultat vers la fin de la 1ère semaine de vie. Cette rapidité est essentielle, notamment pour l'HCS où des décès précoces par déshydratation aiguë peuvent survenir dès la 2ème semaine de vie, mais aussi pour la PCU et l'HC afin de commencer le plus tôt possible le régime restrictif en PHE pour la PCU et un traitement substitutif en hormones thyroïdiennes pour l'HC, dans le but de prévenir les lésions cérébrales.

Lorsqu'un marqueur dépasse le seuil déterminé (ou pour la drépanocytose la mise en évidence d'une hémoglobine anormale), spécifique pour chaque maladie et qui a été fixé pour avoir le moins de faux-positifs et de faux-négatifs possibles, l'enfant est convoqué par le centre de référence ou de compétence de sa région correspondant à la maladie repérée (en théorie, il existe au moins un centre référent ou de compétence par région, selon l'incidence de la maladie et la taille de la région, et par maladie). Là sera pratiqué un test de diagnostic qui viendra confirmer ou non le test de dépistage. Par exemple pour la mucoviscidose, le test de dépistage est le dosage de trypsine mais le test de diagnostic est le dosage du chlore dans la sueur. Si le test de diagnostic confirme que l'enfant est effectivement atteint, celui-ci sera pris en charge par ce centre. Les maladies dépistées sont des maladies rares et les enfants et leur famille doivent être suivis par les spécialistes de chacune de ces maladies.

Les dosages sont effectués par les laboratoires régionaux agréés (1 par région), qui ont l'obligation de rendre leurs résultats tous les trimestres à l'association nationale (AFDPHE) afin qu'ils puissent être rémunérés au prorata du nombre de naissances. L'association nationale garantit ensuite à la Cnamts, le financeur, que le DNN a bien été réalisé dans les régions et que les enfants atteints repérés sont bien pris en charge. La centralisation des résultats permet ainsi d'avoir des données épidémiologiques fiables sur les maladies dépistées et d'évaluer l'efficacité et l'efficacités de la prévention. Cette organisation est résumée dans la **figure 1**.

Figure 1 : L'organisation pratique du DNN en France



Cnamts : Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés / PMI : Protection maternelle et infantile

IV LES PERSPECTIVES

Dans le domaine du DNN, l'avancée majeure récente correspond à la mise au point de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), qui fait passer de la situation « 1 test-1 maladie » à « 1 test-30 maladies » (sans compter les variantes). Cette technique est déjà utilisée dans plusieurs pays avec un nombre variable de maladies dépistées, mais intéressant le plus souvent le déficit en MCAD (*medium-chain acyl-CoA deshydrogenase*), maladie non exceptionnelle (1/17000 à 1/20000 en Europe du Nord), s'exprimant par des crises de décompensation sévères rapidement mortelles, parfois dans un tableau de syndrome de Reye, favorisées par une infection ou un jeûne prolongé. La HAS vient de rendre un avis favorable quant à l'introduction de ce nouveau dépistage après une évaluation socio-économique [5]. De nouvelles évaluations doivent avoir lieu pour d'autres erreurs innées du métabolisme car, à côté de ces avantages, cette nouvelle technologie comporte aussi des aspects négatifs dont l'impact ne peut être mésestimé quand on

s'adresse à l'ensemble d'une population : défaut de dépistage des maladies les plus fréquentes du cycle de l'urée ; dépistage de maladies sévères pour lesquelles n'existe aujourd'hui aucun traitement efficace, ou pour lesquelles les prises en charge les plus attentives et les plus lourdes ne mettent pas à l'abri de décompensations brutales souvent mortelles ; dépistage de maladies métaboliques « bénignes ».

La MS/MS permet aussi de doser des enzymes lysosomales de maladies de surcharge à partir des gouttes de sang séché du papier buvard. Certaines de ces maladies (Fabry, Gaucher, Hürler, Krabbe, Niemann-Pick A et B, Pompe) peuvent maintenant bénéficier de nouveaux traitements, certes très onéreux mais qui amélioreraient le pronostic et pourraient ainsi bénéficier d'une prise en charge précoce [6].

Tout ceci montre que la méthodologie MS/MS éloigne des critères de Wilson, qui limitent le dépistage aux maladies bien connues, d'évolution sévère, accessibles à un traitement efficace prévenant cette évolution et ayant une fréquence suffisante pour justifier l'effort financier nécessaire [6].

Dans tous les cas, l'extension du DNN à d'autres maladies doit obligatoirement être accompagnée d'une information claire, précise, compréhensible et approuvée non seulement par des professionnels de la santé, des éthiciens, des économistes, des associations de malades, mais aussi de la population générale. Il faut aussi s'assurer que la prise en charge de maladies aussi rares et spécifiques soit assurée par des spécialistes en nombre suffisant.

Par ailleurs, d'autres dépistages sont réalisés et en voie de généralisation pour des affections fréquentes, sans utiliser une méthodologie biologique, tel le DNN de la surdité [7]. Ce dépistage, à l'initiative des ORL, est motivé par la forte incidence de cette anomalie (environ 1‰) et par la possibilité d'une prise en charge précoce permettant à l'enfant de garder un développement quasiment normal. Outre le fait qu'il ne s'agit pas d'un dépistage biologique, il se différencie des autres DNN par le fait que le résultat est donné dès la maternité lors de la réalisation du test par oto-émissions acoustiques ou potentiels évoqués automatisés.

CONCLUSION

Le bien fondé de la démarche de prévention infantile des maladies graves par le DNN systématique a largement été démontrée depuis sa mise en place depuis 40 ans. Il est possible que dans un avenir proche, d'autres maladies pourront avoir accès à ce dépistage, mais il faudra rester vigilant quant à leur pertinence.

Faut-il : faire tout ce qui est faisable ? Faire ce qui est demandé par le patient ? Faire même ce qui est très coûteux ? Faire sans réellement informer ? Faire sans véritable bénéfice pour l'individu ? Au maximaliste qui dirait : "dépistons tout ce qui est dépistable", le sage répondra : "ne dépistons que ce qui est utile et en fonction de nos capacités médicales et financières". N'oublions pas que le seul objectif du DNN est d'apporter un bénéfice direct et immédiat au bébé malade. Cette éthique prévaut sur toutes les polémiques possibles. Le programme de DNN peut s'élargir à de nouvelles maladies à condition qu'on puisse les traiter et permettre ainsi aux enfants de vivre normalement.

V ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Wilson JMG, Jungner F. : Principles and Practice of Screening for Disease (Public Health Papers No.34). World Health Organization, Geneva, 1968
- (2) Roussey M. : Les principes et l'organisation du dépistage néonatal en France. Arch Pediatr 2008 ; 15 : 734-7
- (6) Roussey M. : La problématique soulevée par l'extension du dépistage néonatal systématique. Texte dans Recueil des communications des 6èmes Journées d'automne de l'AFPA, Grafficus ed Lyon 2008 ; pp 125-136
- (7) Roussey M, Dauman R. : Dépistage néonatal de la surdité. In Pédiatrie sociale ou l'enfant dans son environnement, Tome 2. Kremp O, Roussey M (eds). Collection Progrès en Pédiatrie. Doin Ed, Rueil Malmaison 2010, 33-44.

RECOMMANDATION

- (3) Art R.1131-21 du Décret n° 2008-321 du 4 avril 2008 relatif à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreintes génétiques à des fins médicales. Arrêté du 22 janvier 2010. : http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=3E5B85064A89A2011B1A31EB4CC07112.tpdjo03v_3?
- (4) Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant. Bilan d'activité 2010 : www.afdphe.asso.fr
- (5) Haute Autorité de Santé. Recommandations en Santé publique. Évaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par la technique de spectrométrie de masse en tandem en population générale en France 1er volet : dépistage du déficit en MCAD. Juin 2011 : www.has-sante.fr

Le Diagnostic Présymptomatique dans les Maladies Neurodégénératives Dominantes Autosomiques

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

C. Goizet,

Université Bordeaux Segalen, Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (EA4576) et Service de Génétique Médicale, Hôpital Pellegrin, CHU Bordeaux, Bordeaux

G. Lesca,

Faculté de Médecine Lyon-Est, Université de Lyon et Service de Génétique Médicale, Hospices Civils de Lyon, Lyon.

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Règles éthiques et recommandations.....	3
II Structure et objectifs de la démarche.....	4
III Expérience dans la MH.....	6
III.1 Attitudes des sujets à risque.....	6
III.2 Caractéristiques des candidats	6
III.3 Résultats et conséquences du DPS	7
IV Extension aux autres maladiesneurodégénératives héréditaires.....	8
IV.1 Maladies de sévérité comparable à la MH.....	8
IV.2 Maladies moins sévères que la MH ou avec bénéfice médical.....	8
IV.3 Particularité du DPS chez les mineurs.....	9
V Annexes.....	10

INTRODUCTION

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 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 (1). Les personnes concernées sont donc asymptomatiques ou, éventuellement, n'ont pas conscience des signes déjà présents de l'affection. Cette approche émergente 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 présymptomatique. En effet, le DPS fût 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).

I 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 (WFN) et l'Association Internationale Huntington (IHA), ces recommandations s'appuyaient sur plusieurs principes éthiques fondamentaux (tableau 1). 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 proposé après l'annonce du résultat.

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 compétences cliniques et génétiques et être déclarées à l'Agence de Biomédecine. Le DPS ne peut pas être proposé aux mineurs en raison de l'absence de bénéfice thérapeutique ou préventif, et dans le but de préserver leur autonomie vis à vis d'une décision future.

II 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 de routine (4). Les candidats au DPS intègrent à leur demande une prise en charge comportant plusieurs consultations avec les membres de l'équipe pluridisciplinaire composée, d'un généticien, d'un neurologue, 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 3 mois environ respectant quatre étapes successives (**figure 1**), dont le but est de permettre une prise de décision mature et de limiter les conséquences 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 (**tableau 1**).

Figure 1 : Structure et objectifs de la démarche

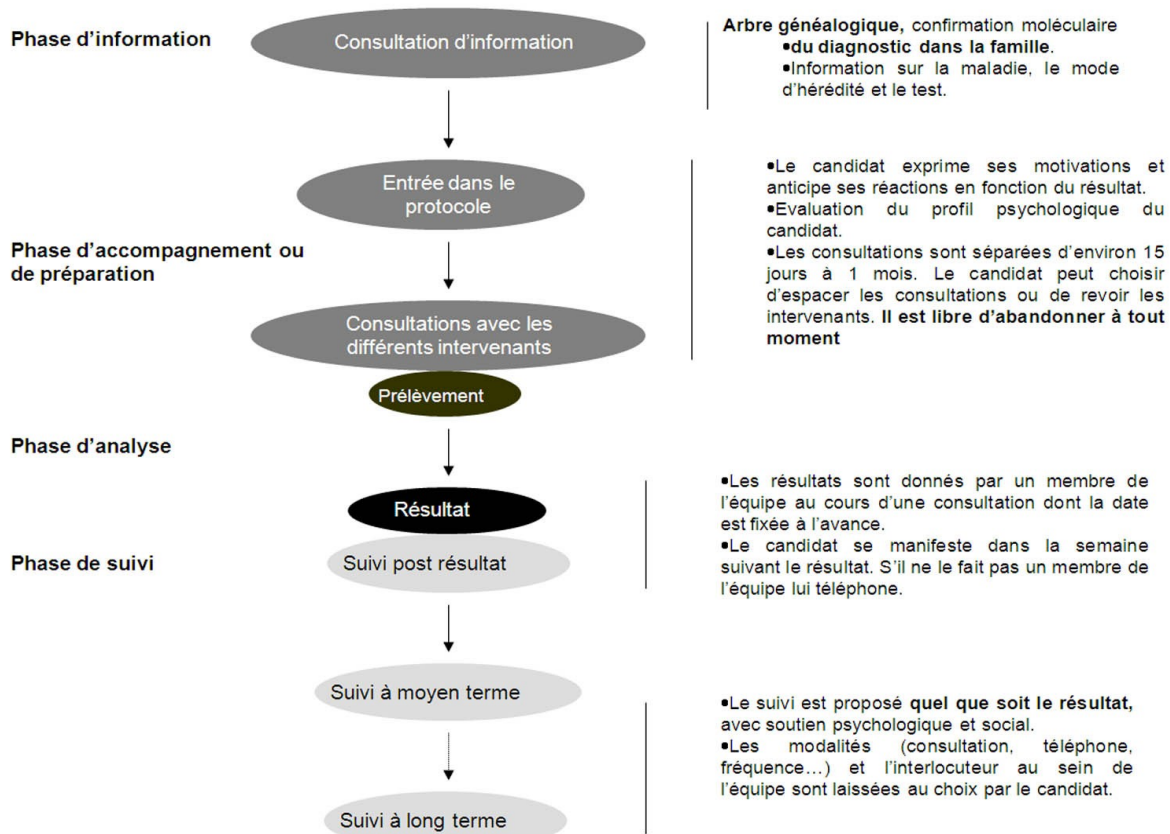


Tableau 1. Principes éthiques à l'origine de la démarche d'encadrement du DPS

- 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. Il est libre de ne pas savoir .
- Non maléfice : l'issue du test ne doit pas être néfaste pour le candidat.
- Bénéfice : le candidat doit tirer un bénéfice du test.
- Justice : chaque citoyen doit pouvoir bénéficier du test s'il le souhaite, sans contrainte financière.

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. A l'issue de ces consultations, des prélèvements sanguins sont réalisés après recueil d'un consentement écrit signé. 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 recommandées 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.

III EXPÉRIENCE DANS LA MH

III.1 ATTITUDES DES SUJETS À RISQUE

Alors que les études réalisées avant que le DPS 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 (5,6,7). 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 décident 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.

III.2 CARACTÉRISTIQUES DES CANDIDATS

Les études menées dans la MH depuis le milieu des années 80 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'intérêt -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 socio-démographiques

Les caractéristiques sociodémographiques des candidats au DPS sont habituellement comparables à celles de la population générale hormis une récurrente sur représentation des femmes (sexe ratio H/F entre 1/1,5 et 1/2 suivant les études) et des catégories socioprofessionnelles élevées (7,8). La sur représentation 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 1ère 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) 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.

III.3 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 : 1) les personnes qui ont débuté la maladie ne sont plus des candidats potentiels pour un DPS ; 2) certains sujets ont dépassé l'âge moyen de début de la maladie entraînant une diminution de leur risque théorique ; 3) 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 étaient infondés. 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 quelque soit le résultat ($\frac{34}{100}$; 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.

IV EXTENSION AUX AUTRES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES HÉRÉDITAIRES

IV.1 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 (*Spino-Cerebellar Ataxia*), des maladies à prion familiales, des formes familiales de maladie d'Alzheimer ou de sclérose latérale amyotrophique, des démences vasculaires (CADASIL)... 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).

IV.2 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.

IV.3 PARTICULARITÉ DU DPS CHEZ LES MINEURS

La problématique du DPS dans le cas des maladies neurodégénérative ne s'applique, dans le cas des mineurs, pas seulement aux maladies autosomiques dominantes mais également à des maladies autosomiques récessives (exemple : ataxie de Friedreich) ou à des maladies liées à l'X (exemple : adrénoleucodystrophie), pouvant débuter à un âge variable. Les questions d'ordre éthique ou psychologiques que soulèvent 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 de 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 par exemple la surveillance cardiaque qui est recommandée à partir de 10-12 ans pour la maladie de Steinert ou les laminopathies A/C ou bien 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 au ministère de la santé. Le récent décret traduit la reconnaissance, par le conseil d'état, du caractère spécifique des tests présymptomatiques par rapport aux tests diagnostiques, et de la nécessité d'une équipe pluridisciplinaire pour répondre de façon appropriée à la demande de DPS, et en limiter les éventuelles

conséquences néfastes.

Dans tous les cas, il faut garder à l'esprit les deux points suivants : 1) 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 ; 2) 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.

V ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Harper P.S. : What do we mean by genetic testing? J Med Genet 1997 ; 34 : 749-52.
- (10) Almquist E.W., Bloch M., Brinkman R., Craufurd D., Hayden M.R. : 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.
- (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 P.G., van de Kamp J.J.P., et coll. : 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 coll. : DNA analysis of Huntington's disease : five years of experience in Germany, Austrian, and Switzerland. Neurology 1999 ; 53 : 801-6.
- (7) Harper P.S., 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., Adam S., Bloch M., Hayden M.R : Adverse psychological events occurring in the first year after predictive testing for Huntington's Disease. *J Med Genet* 1996 ; 33 : 856-62.

Perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Martin Krahn et Nicolas Lévy

Département de Génétique Médicale - Hôpital Timone Enfants, AP-HM,
Et INSERM UMR910 - Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université
Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Approches pharmacologiques dans les maladies monogéniques	4
I.1	Approches « pharmacogénétiques	4
II	La thérapie cellulaire	5
II.1	Cellules souches embryonnaires.....	7
II.2	Cellules souches pluripotentes induites (Induced Pluripotent Stem Cells, ou IPS).....	7
II.3	Cellules souches adultes	7
III	La thérapie génique.....	8
III.1	Thérapie génique in vivo.....	9
III.2	Thérapie génique ex vivo.....	10
III.2.1	Vecteurs viraux.....	11
III.2.2	Systèmes de transfert non-viraux (vecteurs non-viraux).....	11
III.2.3	Utilisation d'un transgène.....	12
III.2.4	Modulation de l'expression.....	13

Introduction

Dans le domaine de la génétique médicale, ces 20 dernières années ont conduit à une progression fulgurante dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques des maladies monogéniques. Malheureusement, malgré des progrès énormes dans l'identification des gènes et des études fonctionnelles permettant de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués, peu de ressources thérapeutiques sont disponibles à ce jour pour le traitement des maladies génétiques.

Comme pour tout type de maladie, la prise en charge thérapeutique des maladies génétiques peut comporter un versant **symptomatique**, visant à corriger les conséquences phénotypiques résultant du défaut génétique (comme par exemple les mesures de rééducation fonctionnelle dans les myopathies d'origine génétique, ou encore les mesures d'éducation spécialisée pour les déficiences intellectuelles d'origine génétique).

Mais, comme pour toute maladie, l'objectif définitif est une prise en charge **étiologique**, permettant d'agir directement sur la cause afin d'obtenir un effet curatif. En raison de la particularité des maladies génétiques d'être causées par une anomalie de l'ADN induisant un défaut de fonctionnement cellulaire, plusieurs approches thérapeutiques « innovantes » ont été imaginées depuis déjà plus d'une trentaine d'années : la **thérapie génique** visant à corriger directement le défaut génétique causal ; et la **thérapie cellulaire** visant à remplacer des cellules défectueuses d'un tissu.

Le concept très novateur consistant à s'attaquer aux origines génétiques et cellulaires des maladies, regroupé parfois sous le terme de biothérapies, est particulièrement séduisant dans sa linéarité théorique qui permettrait de corriger de manière ciblée l'anomalie génétique et/ou cellulaire. Néanmoins, au cours des 20 dernières années, ce concept s'est heurté à la complexité des systèmes biologiques, et les progrès tant attendus ont été moins rapides qu'espérés. Cependant, depuis quelques années, les preuves de principe expérimentales se succèdent de même que les succès thérapeutiques cliniques.

Un premier point important à retenir est que ces biothérapies feront sans aucun doute partie de l'arsenal thérapeutique contre les maladies génétiques dans les années à venir, à condition de cibler les indications et de ne jamais oublier la nécessaire évaluation du rapport risque/bénéfice pour le patient. Il faut souligner aussi que la mise en œuvre d'essais cliniques de thérapie cellulaire ou de thérapie génique est lourde en raison de contraintes réglementaires particulières.

Un deuxième point essentiel à retenir est que les approches thérapeutiques pharmacologiques sont, comme pour toute autre maladie, une piste à poursuivre pour les maladies génétiques. Effectivement, l'approche pharmacologique pour le traitement des maladies génétiques a sans doute, à tort, été délaissée. Une des raisons essentielles de ce

délaissement en est certainement l'engouement important pour les biothérapies, leur élégance théorique et les espoirs qu'elles suscitent. Une autre raison est liée aux connaissances insuffisantes des mécanismes physiopathologiques qui, à partir d'un défaut génétique dans un gène donné conduisent au défaut cellulaire, ne permettant donc pas l'identification d'une cible pharmacologique précise. La meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques et les possibilités de criblage pharmacologique à haut débit sur des modèles cellulaires ou vivants, conduisent aujourd'hui à un net regain d'intérêt pour ces approches pharmacologiques « classiques », et les succès thérapeutiques se multiplient.

L'objectif de ce chapitre sera de donner une vue d'ensemble conceptuelle des différentes approches thérapeutiques envisagées pour les maladies génétiques.

I APPROCHES PHARMACOLOGIQUES DANS LES MALADIES MONOGÉNIQUES

Classiquement, la clé pour une approche pharmacologique éventuelle est la connaissance du mécanisme physiopathologique de la maladie concernée. 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 » !). Des molécules actives sur ces cibles pharmacologiques peuvent alors être testées, sur des modèles cellulaires ou animaux de la pathologie. 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 d'ailleurs même de chercher des composés actifs pour des maladies au mécanisme physiopathologique encore méconnu, mais à condition de disposer d'un test fonctionnel cellulaire pour mesurer l'efficacité potentielle des différentes molécules.

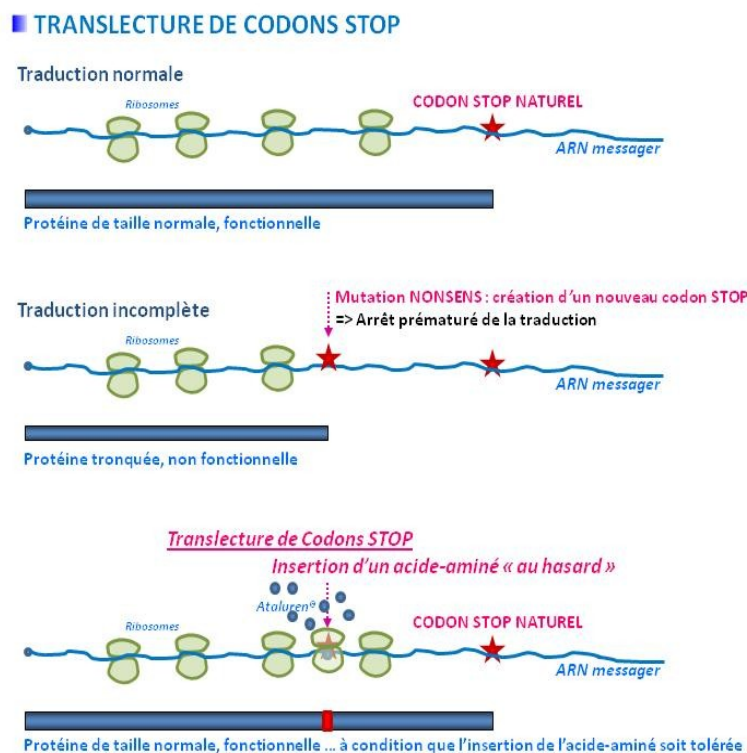
De nombreux chercheurs misent sur cette approche pharmacologique « classique », et actuellement mieux maîtrisée que les biothérapies.

I.1 APPROCHES « PHARMACOGÉNÉTIQUES

Certaines approches pharmacologiques dans les maladies génétiques ciblent aujourd'hui directement l'anomalie génétique causale (et non « seulement » les conséquences cellulaires induites). 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, mais auront un effet direct au niveau génétique.

Une autre stratégie en cours d'évaluation est l'approche de « **translecture de codons stop** » (ou « stop-codon readthrough »). Cette approche vise à corriger les mutations de type non-sens, qui représentent 10 à 20% des mutations au niveau des gènes. Normalement, la lecture complète d'un ARNm, 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®), un codon stop formé par une mutation non-sens peut être « corrigé » : un acide-aminé pris au-hasard 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 !).

Figure 1 : Approches pharmacogéniques



II LA THÉRAPIE CELLULAIRE

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.

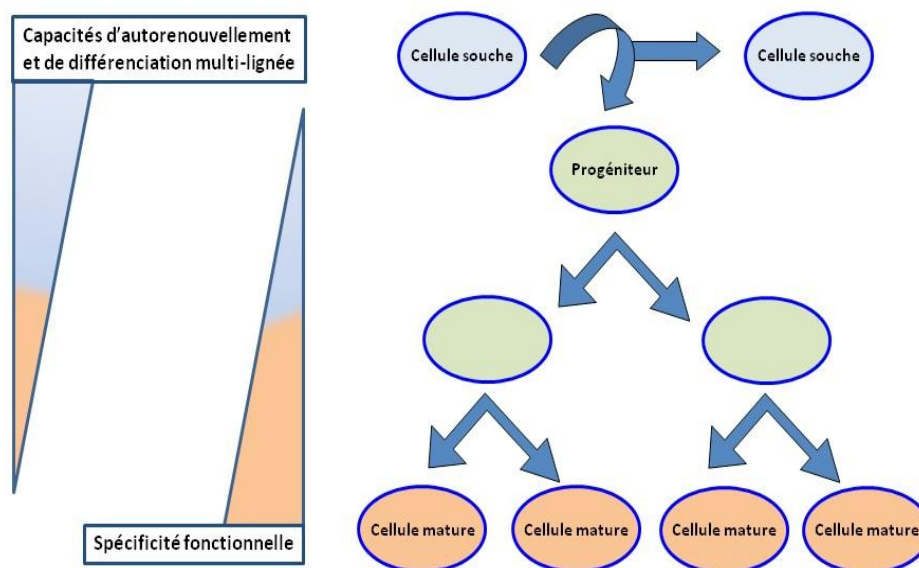
Cette notion de thérapie cellulaire repose donc sur la notion de cellule souche. Les cellules souches ont par définition des capacités **d'auto-renouvellement** et de **différenciation**

multi- lignée. 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'auto- renouvellement ; et en 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'auto-renouvellement.

De manière très schématique, le concept de thérapie cellulaire vise à remplacer des cellules défectueuses dans un tissu donné grâce à l'apport de cellules souches. Les capacités de différenciation multi-lignée des cellules souches permettraient la formation de cellules fonctionnelles dans ce tissu, et la capacité d'auto-renouvellement assurerait le maintien d'un stock de cellules et ainsi une régénération maintenue à moyen voire à long terme. Grâce au fort potentiel régénératif des cellules souches, cette approche est donc très prometteuse à des fins thérapeutiques, mais comporte pour la même raison un risque de dégénérescence cellulaire et de croissance cellulaire incontrôlée, voire tumorale, qui doit absolument être maîtrisé et surveillé pour toute application clinique.

Les sources cellulaires éventuelles pour la thérapie cellulaire sont **les cellules souches embryonnaires**, les **cellules souches adultes** et depuis plus récemment **les cellules souches pluripotentes induites** (Induced Pluripotent Stem Cells, ou **IPS**, en anglais).

Figure 2 : Thérapie cellulaire



II.1 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. 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.

II.2 CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, OU 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 collaborateurs (2007) ont montré qu'il était possible de reprogrammer des cellules matures grâce à l'expression de différents facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Kif4, 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.).

II.3 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.

III LA THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique est définie comme la modification du matériel génétique de cellules vivantes par transfert d'acide nucléique, et ceci à des fins thérapeutiques.

Le concept de thérapie génique est déjà ancien, puisqu'il est né au début des années 1970 lorsque des scientifiques (Rogers, puis Friedmann et Roblin) ont évoqué la possibilité d'utiliser de l'ADN exogène pour remplacer un ADN défectueux chez des personnes atteintes de défauts génétiques. Cette idée s'est concrétisée sur le plan expérimental et a conduit à un premier essai clinique de thérapie génique en 1990 dans le cadre d'une maladie du système immunitaire (ADA-SCID, essai mené par l'équipe du Dr. French Anderson aux États-Unis). Mais il a fallu attendre l'an 2000 pour aboutir au premier succès mondial de thérapie génique, toujours pour une maladie immunitaire (X-SCID, essai mené par l'équipe du Pr. Alain Fischer en France).

Ce concept de thérapie génique a été initialement destiné aux maladies génétiques monogéniques, dans lesquelles des mutations causales dans un gène donné sont responsables de la maladie que présente le patient.

Par la suite cette approche a été étendue sur le plan expérimental à d'autres maladies notamment des maladies polyfactorielles (avec des applications envisagées notamment en cancérologie ou pour les maladies infectieuses), mais ceci ne sera pas abordé dans ce chapitre. A ce jour, plus de 1700 essais cliniques ont été répertoriés dans la « *Journal of Gene Medicine Trial Database* » (<http://www.abedia.com/wiley>) à travers le monde (surtout des essais de phase I), en majorité dans le domaine de la cancérologie (plus de 60% de la totalité des essais), mais également dans les maladies monogéniques (8% des essais).

Théoriquement, la thérapie génique peut s'envisager selon différentes modalités. Tout d'abord, il faut souligner que la thérapie génique chez l'homme n'est pas envisageable sur

des cellules germinales. Effectivement ceci correspondrait à l'introduction d'une modification génétique au niveau de cellules souches embryonnaires ou de cellules germinales, donc l'introduction de modifications transmissibles à la descendance. Ceci pose tout d'abord des problèmes techniques, mais surtout une problématique importante sur le plan éthique (implication d'une telle approche sur la modification ou l'amélioration de l'espèce, etc.). On peut noter cependant que cette approche est couramment utilisée chez l'animal où elle est appelée transgénèse : le transfert de gènes dans des cellules souches embryonnaires ou des cellules germinales chez l'animal est utilisé notamment pour la création de modèles animaux de pathologie, pour la production de substances pharmacologiques (création de « bio-réacteurs »), ou encore pour des implications agro-alimentaires.

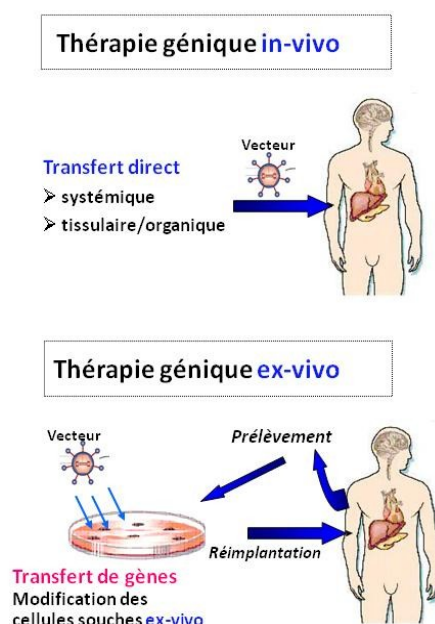
La thérapie génique germinale n'est donc pas envisageable chez l'homme. Par contre, la thérapie génique sur des cellules somatiques a pu être envisagée selon différentes modalités : la thérapie génique *in vivo* et la thérapie génique *ex vivo*.

III.1 THÉRAPIE GÉNIQUE IN VIVO

Tout d'abord, la thérapie génique *in vivo* consiste en un transfert de gènes direct, soit par injection systémique dans la circulation sanguine, soit par injection locale au niveau d'un tissu ou organe. On peut citer comme exemple ici le transfert de gènes direct par injection au niveau de la rétine, dans les approches de thérapie génique de certaines maladies génétiques affectant la vision.

Un autre exemple est celui des dystrophies musculaires d'origine génétique, dans lesquelles l'objectif pourrait être d'effectuer un transfert de gènes dans différents muscles et ceci par injection directe dans le muscle, ou par injection dans la circulation sanguine.

Figure 3 : Thérapie génique *in vivo* et *ex-vivo*



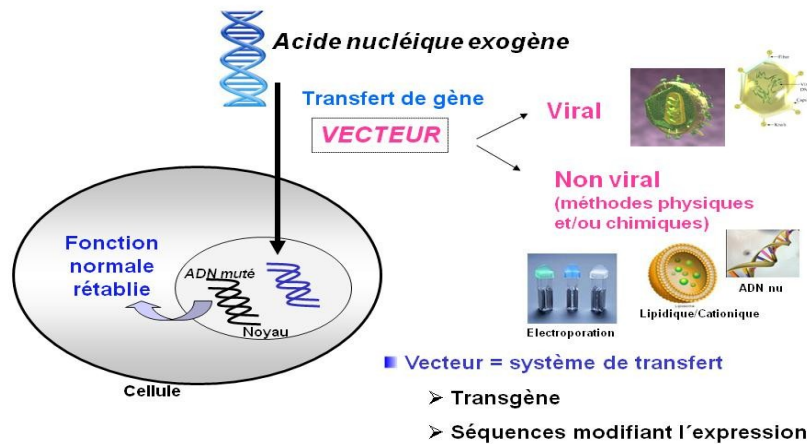
III.2 THÉRAPIE GÉNIQUE EX VIVO

La deuxième modalité de transfert de gènes est la thérapie génique ex vivo. Cette approche comporte d'abord une étape de prélèvement de cellules chez l'individu à traiter. Ces cellules seront mises en culture, et on pourra alors effectuer le transfert de gènes sur les cellules en culture. Les cellules modifiées par le transfert de gènes pourront alors être réimplantées chez l'individu. Cette approche de thérapie génique ex vivo est développée actuellement notamment pour le transfert de gènes dans des cellules souches adultes. L'objectif est alors d'effectuer un transfert de gènes unique sur des cellules souches prélevées chez un individu. Ces cellules souches seront donc modifiées par le transfert de gènes, puis réimplantées dans l'individu. Puisque les cellules souches ont des capacités d'auto-renouvellement cette approche permet théoriquement d'effectuer un transfert de gènes unique et stable. Les cellules matures formées par la différenciation de ces cellules souches porteront la modification génétique introduite, permettant ainsi dans le cadre des maladies monogéniques la correction du défaut génétique. Cette approche a été utilisée avec succès sur le plan expérimental et même dans certains essais cliniques, notamment visant des cellules souches hématopoïétiques dans le cadre de différentes maladies génétiques touchant les constituants du sang (certains déficits immunitaires, hémoglobinopathies).

Toutes les approches de thérapie génique sont basées sur la notion de transfert de gènes, qui consiste à transférer un acide nucléique exogène dans une cellule porteuse d'une anomalie génétique. Au final, ce transfert de gènes a pour objectif de permettre la correction de l'anomalie génétique au niveau de la cellule et ainsi de rétablir une fonction cellulaire normale.

Le transfert de gènes s'effectue grâce à un outil appelé vecteur, qui permettra de transférer dans la cellule une séquence codante (transfert de « transgène »), ou des séquences modifiant l'expression de certains gènes présents au niveau de la cellule. On distingue les vecteurs de type viral et les systèmes de transfert non-viraux (ou vecteurs non-viraux).

Figure 4 : Thérapie génique ex vivo



III.2.1 Vecteurs viraux

Les différents types de vecteurs viraux ont été développés à partir de virus sauvages rendus non répliatifs par modification de leur génome. Les virus sauvages naturels ont développé au cours de millions d'années d'évolution des systèmes très efficaces de transfert de gènes, puisque le cycle viral implique le transfert du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Ainsi, le principal avantage des vecteurs viraux est l'efficacité du transfert de gène, puisque le mode d'infection propre au virus sauvage est conservé.

Tous les vecteurs viraux posent néanmoins des problèmes de toxicité et/ou d'immunogénicité.

De nombreux types différents de vecteurs viraux ont été développés, chaque type ayant des avantages et inconvénients particuliers, et notamment la spécificité du vecteur pour le transfert de gène dans un type cellulaire donné ; la taille plus ou moins grande de la séquence pouvant être transférée ; la stabilité ou non du transfert de gène en fonction de l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule hôte, ou au contraire la perte du vecteur au cours de la réplication cellulaire ; on encore la toxicité spécifique du type de vecteur. A ce jour, les plus fréquemment utilisés sont les vecteurs rétroviraux, les vecteurs lentiviraux, les vecteurs adénoviraux et les vecteurs adénoassociés (« A.A.Vs »).

III.2.2 Systèmes de transfert non-viraux (vecteurs non-viraux)

Les systèmes de transfert de gène non viral sont basés sur des méthodes physicochimiques. De nombreux procédés ont été développés, basés sur le transfert d'acides nucléiques

« nus », ou associés à des composés chimiques (surtout lipidiques ou peptidiques) dans le but de stabiliser les acides nucléiques et de faciliter le passage membranaire et le cheminement vers le noyau des cellules cibles. Ces acides nucléiques, « nus » ou associés à des composés chimiques, pourront être délivrés dans l'organisme soit directement par injection (locale ou systémiques), soit couplé à l'utilisation de procédés physiques comme l'électroporation ou l'utilisation de champs magnétiques.

Les méthodes de transfert génique non viral présentent un risque de toxicité réduit, mais aussi une efficacité inférieure par comparaison à un transfert viral.

Les différents types de vecteurs permettent donc le transfert d'acides nucléiques exogènes dans une cellule porteuse d'une anomalie génétique. Dans l'objectif de corriger cette anomalie, les principales stratégies développées sont basées sur l'utilisation d'un transgène, ou sur la modulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes présents au niveau de la cellule.

III.2.3 Utilisation d'un transgène

La première stratégie principale pour la thérapie génique est d'utiliser un transgène, c'est-à-dire une séquence codant un ARNm messager d'intérêt. Ce transgène correspond idéalement à la totalité de la séquence codant la protéine d'intérêt, associée à des séquences régulant l'expression de ce transgène (il s'agira si possible des éléments régulateurs naturels du gène d'intérêt, ou à défaut d'autres séquences régulatrices).

En effet, dans les maladies monogéniques, l'objectif du transfert d'un transgène est de corriger l'anomalie génétique causée par les mutations du gène impliqué. Afin de restaurer l'expression d'une protéine fonctionnelle, des copies normales de la séquence codante du gène impliqué sont transférées dans les cellules cibles porteuses du déficit génétique. Puisque l'expression thérapeutique du transgène doit conduire à la synthèse dans la cellule d'une protéine à des niveaux thérapeutiques, c'est-à-dire ni en trop faible quantité, ni en excès, une régulation précise du niveau d'expression est alors requise : celle-ci doit reproduire le plus fidèlement possible l'expression de la protéine sauvage dans le tissu d'intérêt. Avec les systèmes de transfert disponibles actuellement, cela n'est que partiellement réalisable, notamment en raison de contraintes liées à la taille du transgène, qui est limitée en fonction du vecteur utilisé. Il reste ainsi souvent difficile de recréer les conditions de régulation reproduisant parfaitement les situations physiologiques.

Néanmoins, les éléments régulateurs, en particulier le promoteur du gène, peuvent être choisis de manière à permettre dans la mesure du possible un niveau le plus approprié et spécifique du tissu cible. La spécificité tissulaire du promoteur est particulièrement importante, car une expression ectopique du produit du transgène dans des cellules du

système immunitaire capables de présenter les antigènes, ou dans d'autres cellules non cibles, peut s'avérer délétère.

III.2.4 Modulation de l'expression

Une deuxième stratégie de transfert de gènes est la modulation de l'expression, approche très développée au cours de ces dernières années. L'objectif est ici d'apporter à la cellule des acides nucléiques qui vont interférer avec certains ARNm exprimés dans la cellule cible, porteuse du déficit génétique à corriger. Cette modulation de l'expression peut être quantitative ou qualitative.

La modulation de l'expression quantitative peut avoir pour objectif de dégrader de manière ciblée certains ARNm, notamment par le phénomène appelé « ARN interference » (par exemple pour dégrader l'ARNm d'une protéine mutée toxique pour la cellule), ou au contraire de stabiliser dans la cellule certains ARNm (par exemple des ARNm rendus instables par une mutation).

La modulation de l'expression peut également être qualitative. Le terme de « chirurgie du gène » est souvent utilisé pour cette stratégie, qui consiste en l'élimination ciblée de mutations au niveau de la cellule. Si une cellule est porteuse de mutations, responsables d'un défaut cellulaire, on peut imaginer que d'enlever ces mutations permettra de conduire au rétablissement d'un bon fonctionnement cellulaire. Il reste encore à ce jour très difficile d'éliminer des mutations directement au niveau génomique (différentes approches notamment de correction par recombinaison homologue ciblée existent, mais sont encore trop peu efficaces). Par contre, des techniques beaucoup plus efficaces ont été mises au point au cours de ces dix dernières années pour éliminer des mutations de manière ciblée au niveau de l'ARNm produit à partir d'un gène muté. Les mutations persistent alors au niveau du gène (au niveau génomique), mais l'élimination des mutations au niveau de l'ARNm permettra de synthétiser une protéine fonctionnelle. Ces approches ont par ailleurs l'avantage d'agir directement sur un ARNm exprimé par la cellule, donc un ARN messager endogène soumis à une régulation précise : théoriquement, les niveaux d'expression protéique après correction de l'anomalie génétiques seront donc proches des niveaux endogènes. Les principales techniques de « chirurgie du gène » sont actuellement le « saut-d'exon » (« exon-skipping ») et le « trans-épissage » (« trans-splicing »).

Principe de la modulation de l'expression par les stratégies du "saut-d'exon" et du "trans-épissage".

Lorsqu'une cellule est porteuse d'une mutation dans un gène, cette mutation va se retrouver après transcription au niveau de l'ARNm. Le phénomène de transcription permet d'obtenir en différentes étapes un ARNm qui sera ensuite traduit en

protéine. La première étape de la transcription permet la synthèse d'un pré-ARNmessenger qui comporte à la fois des exons avec l'information génétique codante et des introns qui seront éliminés au cours du phénomène d'épissage.

- **Le principe du « saut d'exon »**

Il consiste à intervenir sur le phénomène d'épissage pour induire une délétion ciblée d'un exon porteur d'une mutation (cette approche peut également concerner plusieurs exons en fonction du type de mutation), et permettant de maintenir un cadre de lecture ouvert. Suite au saut d'exon, l'ARNmessenger mature permettra la synthèse d'une protéine pour laquelle une partie aura été délétée : un prérequis essentiel à ce type d'approche est donc que cette protéine résultante, bien que partiellement tronquée, maintienne une fonctionnalité suffisante. L'intervention sur l'épissage est possible en bloquant des sites essentiels dans ce phénomène (sites d'épissage et de régulation de l'épissage), en utilisant des séquences « antisens » qui vont masquer ces sites. Les séquences antisens peuvent être introduites dans les cellules cibles par un vecteur (viral ou non viral). Il peut s'agir notamment d'oligonucléotides qui peuvent être administrés sous différentes formes biochimiques, avec un effet direct au niveau génétique : donc une approche de thérapie génique, mais basée sur une approche pharmacologique. Plusieurs essais thérapeutiques prometteurs basés sur le « saut d'exon » sont actuellement en cours.

- **Le principe du « trans-épissage »**

Il consiste à remplacer une séquence mutée par une séquence normale : en agissant sur le phénomène d'épissage, il est ainsi possible de remplacer une partie d'un pré-ARNmessenger porteur d'une mutation, par une séquence normale apportée par le transfert de gènes. Ce remplacement de la séquence mutée par une séquence normale au niveau du pré-ARN messenger permet donc d'obtenir un ARNmessenger mature normal qui sera traduit en protéine. Cette protéine ne comportera plus la mutation et pourra donc être fonctionnelle au niveau de la cellule.

Figure 5 : Le principe du "saut d'exon"

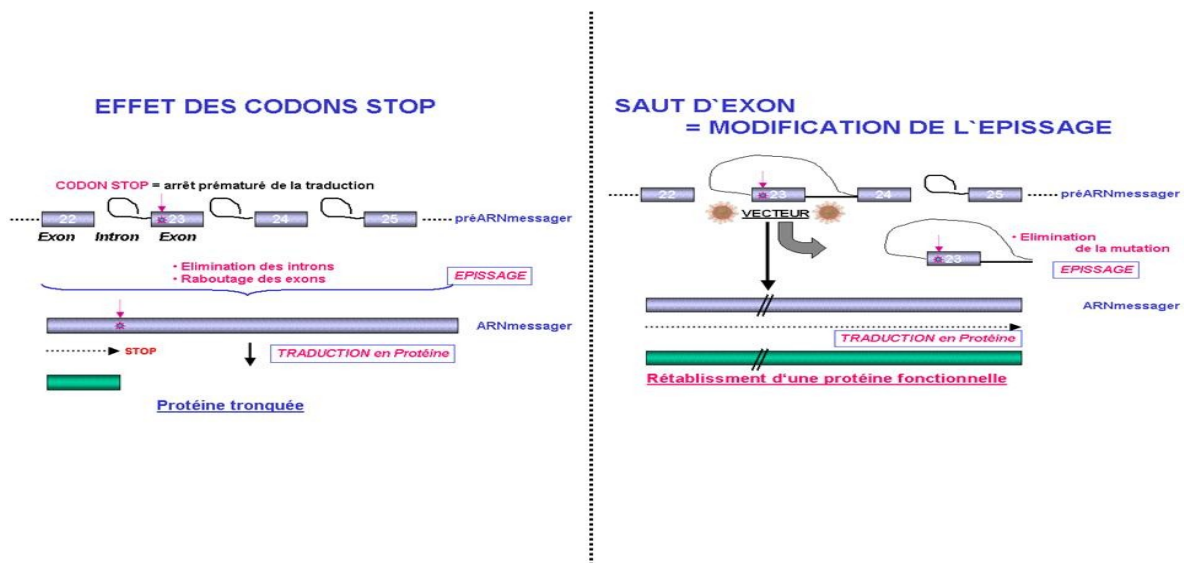
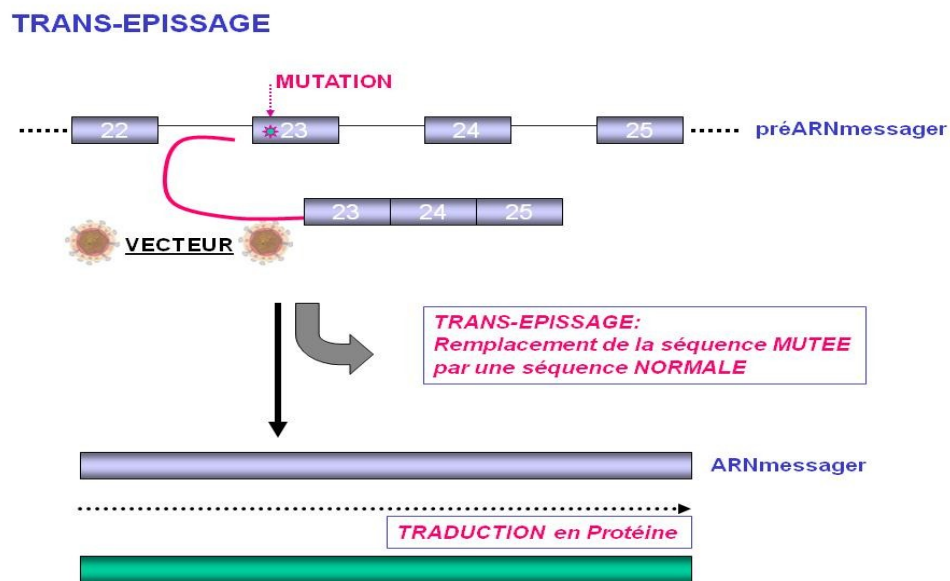


Figure 6 : Le principe du "trans-épissage"



CONCLUSION

Grâce aux progrès importants dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies monogéniques, des approches thérapeutiques ciblées sont actuellement en développement. Le contexte des maladies monogéniques se confronte à des obstacles particuliers, dont le nombre souvent réduit d'effectifs de patients pour les essais cliniques, et le faible intérêt que peut porter l'industrie pharmaceutique au développement de « médicaments » dont le marché éventuel est restreint. Pour favoriser le développement d'approches thérapeutiques prometteuses pour les maladies rares, le statut de

« médicament orphelin » a été créé au niveau européen, ce qui permet de solliciter des aides spécifiques (subventions, frais réduits d'enregistrement, avantages d'exploitation, etc.).

Les résultats prometteurs se multiplient aussi bien pour des approches pharmacologiques, que pour des approches de thérapie cellulaire et/ou génique, et qu'il s'agisse de preuves de principe sur des modèles cellulaires ou animaux, ou d'essais cliniques. Mais suite à des premiers succès pour une maladie donnée, la persévérance des chercheurs reste essentielle pour le chemin qui reste à parcourir jusqu'à une éventuelle autorisation de mise sur le marché.

(Quelques exemples marquants de progrès dans les approches thérapeutiques des maladies monogéniques : http://umof.univ-nantes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique15/site/html/genetique15_tableau.pdf)

Liens utiles :

www.orpha.net

www.afssaps.fr

www.clinicaltrials.gov

www.afm-france.org

www.abedia.com/wiley

Considérations éthiques, juridiques et psychologiques en génétique

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Dr Perrine MALZAC

Praticien Hospitalier en génétique médicale et coordonnatrice de l'Espace Ethique
Méditerranéen. Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Prescription et réalisation de tests génétiques.....	2
II L'information familiale: Devoir moral ou obligation légale envers les apparentés ?.....	4
III Diagnostic prénatal et diagnostic préimplantatoire.....	5
IV Dépistage et prédiction en génétique.....	9
V Annexes.....	11

Ce chapitre a pour but d'évoquer les dilemmes éthiques soulevés par la pratique de la génétique humaine, tout en déclinant son encadrement juridique (loi de bioéthique édictée en 1994, révisée en août 2004 puis en juillet 2011 [1]) et en considérant le contexte psychologique en 4 chapitres.

I PRESCRIPTION ET RÉALISATION DE TESTS GÉNÉTIQUES

Dans la loi de bioéthique, le terme d'usage n'est pas « tests génétiques », mais « examens des caractéristiques génétiques » (L.1131-1 à 7 du Code de Santé Publique (CSP) et L.16-10 et 13 du Code Civil (CC)). Cet encadrement juridique français se double de règles européennes, le protocole additionnel à la Convention d'Oviedo sur les Droits de l'Homme et la Biomédecine (27 novembre 2008) relatif aux tests génétiques à des fins médicales.

Les principes éthiques et les règles juridiques régissant l'usage des tests génétiques, affirmés dans la loi de bioéthique ainsi que dans les textes européens, sont les suivants:

- **primauté de l'individu** : les tests génétiques ne peuvent être réalisés que dans l'intérêt direct d'un individu (L.1131-1 du CSP). Toutefois, les données génétiques d'une personne pouvant être utiles à ses apparentés, l'intérêt de la famille est pris en considération. Il est ainsi possible, dans certains cas, de réaliser des tests génétiques sur une personne, sans qu'elle n'en retire de bénéfice à titre individuel, uniquement dans l'intérêt de tiers familiaux.
- **droit à l'information** : une information détaillée doit être délivrée à la personne avant et après la réalisation du test, lors de consultations individuelles, en face à face avec un médecin spécialisé. Seul le médecin prescripteur est habilité à rendre le résultat (L.1131-1-3 du CSP).

- **nécessaire recueil du consentement** : il s'agit dans ce cas d'un consentement libre et éclairé, recueilli par écrit (L.16-10 du CC).
- **protection des personnes incapables de consentir** : ces personnes, qu'il s'agisse de mineurs ou de majeurs sous tutelle, sont davantage protégées du fait de leur plus grande vulnérabilité. Le consentement de leurs représentants légaux est nécessaire, mais leur assentiment est recherché également, dans la mesure du possible. De plus, des examens génétiques ne sont prescrits que lorsqu'eux-mêmes, ou leur famille, peuvent personnellement bénéficier de mesures préventives ou curatives immédiates
- **préservation du droit de ne pas savoir** : chacun doit être libre de ne pas réaliser un test, mais aussi, une fois le test réalisé, de ne pas prendre connaissance des résultats obtenus.
- **utilité clinique et qualité des tests** : l'utilité clinique (pour le sujet ou pour sa famille) devrait être un critère majeur de prescription. Quant aux tests eux-mêmes, leur validité (lors de la réalisation et 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 et, hors du cadre spécifique du diagnostic prénatal, c'est l'Agence de la Biomédecine qui est chargée de délivrer un agrément aux biologistes qui pratiquent les tests génétiques (L1131-3 du CSP).
- **droit à un suivi médical individualisé et au conseil génétique** : la réalisation d'un test doit être suivie, chaque fois que nécessaire, d'une prise en charge personnalisée et d'une démarche de conseil génétique.
- **respect de la confidentialité et respect de la vie privée** au regard de tiers, comme les assureurs ou les employeurs par exemple, et ce afin d'éviter tout risque de discrimination ou de stigmatisation (L.16-13 du CC).

Suite à la dernière révision de la loi de bioéthique, de nouvelles règles de bonnes pratiques applicables à la prescription et à la réalisation des tests génétiques devraient être édictées, prochainement, par le Ministre chargée de la Santé sur proposition de l'Agence de la Biomédecine, en conformité avec les principes éthiques rappelés ci-dessus.

Au niveau sociétal, la **question de l'égalité d'accès aux services** se pose de façon particulièrement aigüe en génétique humaine, tant pour l'accès à une démarche diagnostique que l'inclusion dans des protocoles de recherche ou la prescription des nouvelles thérapeutiques.

II 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...).

Pour le médecin, deux valeurs entrent en conflit : d'une part, le respect de la confidentialité sur les données de santé du « cas index », d'autre part, un devoir d'information vis-à-vis de la parentèle.

Déclinaison de ce conflit de valeurs sous forme de questions :

Le médecin peut-il simplement proposer au malade d'éclairer les membres de sa famille ?

Doit-il plutôt l'inciter à le faire, ou même tenter de le convaincre?

Qui doit transmettre l'information ?

- La personne malade ou son représentant légal auquel vient d'être annoncé l'origine génétique de la pathologie ? Ainsi, outre le poids de la maladie, les personnes concernées devront elles assumer la charge de délivrer un message complexe à des parents plus ou moins proches, ou supporter la culpabilité de ne pas l'avoir fait ?
- Le médecin ou un tiers désigné pourraient-ils se substituer au sujet en difficulté au regard de ce devoir d'information ?

Dans quels cas l'information devra-t-elle être délivrée?

- Chaque fois que les proches sont susceptibles de bénéficier d'un traitement efficace ou d'un moyen de prévention ?
- Est-ce que le fait de n'avoir pu accéder à une démarche de conseil génétique ou à un diagnostic prénatal doit être considéré comme une perte de chance pour le parent resté dans l'ignorance ?

Que faire au cas où le patient refuserait de contacter ses proches au nom de son droit à garder le secret ?

En un mot, quels sont les devoirs et les responsabilités de chacun des partenaires de la relation de soin vis à vis des apparentés à risque ?

Encadrement juridique actuel depuis juillet 2011 (L.1131.1.2 du CSP) :

Lors de la révision de la loi de bioéthique en juillet 2011, le législateur a tenté de répondre à chacune de ces questions de la façon suivante :

- 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
- Ce devoir d'information de la parentèle échoit en priorité au consultant, au cas où serait identifiée « une anomalie génétique grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention... ou de soin »
- La possibilité de recourir à un conseil génétique est considérée comme une mesure de prévention
- 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 ».

III DIAGNOSTIC PRÉNATAL ET DIAGNOSTIC PRÉIMPLANTATOIRE

Le diagnostic prénatal est un acte médical individuel qui concerne une femme enceinte et s'intéresse à l'état de santé de l'enfant qu'elle porte. Le but est de prévenir certaines des conséquences de l'affection diagnostiquée par exemple en organisant une prise en charge précoce et adaptée de l'enfant, dès la naissance.

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 lorsque

« 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 ».

L'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 toutes analyses biologiques 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'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.

Le diagnostic préimplantatoire 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. C'est cette démarche de tri embryonnaire qui appelle à une réflexion éthique.

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.
- Le 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.

Les principaux enjeux éthiques du diagnostic prénatal et du diagnostic préimplantatoire au niveau individuel et collectif

- Questionnement éthique au sein des CPDPN, **face à une décision difficile : discussion collégiale et examen de chaque situation au cas par cas.**

Comment définir les critères de « particulière gravité » et « d'incurabilité »?

Qui doit juger de la particulière gravité : les familles en fonction de leur vécu, les médecins sur des bases scientifiques ou la société sur des éléments socio-économiques ? Et comment agir 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 peut-être 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 le long de la vie ?

Comment gérer l'incertitude diagnostique, fréquente en période prénatale ?

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 pour toute décision d'IMG cherche à garantir que :**

- elle soit contextualisée, analysée au cas par cas
- elle émane d'une discussion collégiale
- elle prenne en compte la position des parents jusque dans leur perception subjective et traumatisante de la situation

- soit mis en place un accompagnement psychologique du couple afin de réhabiliter l'écoute et le temps

• La question de l'eugénisme

La question du potentiel eugéniste des pratiques de DPN et de DPI est parfois éludée, ne serait-ce que dans leur énoncé même. C'est la dimension diagnostique qui est valorisée quitte à passer sous silence ce qu'il advient en cas de résultat 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.

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. » (L.16-4 du Code Civil)

« 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 Euros d'amende. » (L.214-1 du Code Pénal)

Comme démarche individuelle, résultant du choix libre, éclairé et toujours difficile d'un couple confronté à la perspective des souffrances à venir (pour l'enfant s'il venait à naître, pour leur entourage et pour eux-mêmes), DPN ou DPI sont socialement acceptés et encadrés.

Les craintes de dérive eugéniste 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).

Ce qui peut protéger ces pratiques, DPN comme DPI, d'un penchant par trop eugénique c'est :

- la conscience de chacun, praticien comme citoyen, du potentiel eugéniste que recèlent certaines démarches en génétique
- l'encadrement juridique : loi de bioéthique régulièrement réévaluée à la suite de débats de société
- le choix délibéré et assumé (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 rapport entre savoir et pouvoir, au respect de la vie et de la dignité, au regard que nous portons sur l'autre dans sa différence et sa singularité.

IV DÉPISTAGE ET PRÉDICTION EN GÉNÉTIQUE

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 chorée de Huntington, affection neurologique grave qui débute à l'âge adulte). Cependant, avec l'acquisition de nouvelles connaissances et de nouvelles techniques d'exploration du génome humain, les perspectives d'extension de la médecine prédictive à de nombreuses affections plus communes telles que le diabète, l'obésité ou les cancers, par la recherche de facteurs de susceptibilité génétique, semblent probables. Le but serait de mieux protéger les sujets reconnus comme vulnérables en leur proposant une prise en charge adaptée.

Déclinaison des conflits de valeur sous forme de questions :

Sommes-nous bien sûrs que le patient tirera plus de bénéfices que d'inconvénients d'une telle connaissance ? Peut-on, sans risque d'erreur, appliquer des données probabilistes à des prises en charge individuelles ? S'agit-il de prédire quelque chose de prédéterminé et d'irréremédiablement fixé ou plus simplement de prévoir ce qui peut arriver, en reconnaissant une marge d'incertitude ? 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 fabricants de tests génétiques ? Comment éviter les risques de discriminations pour l'accès à des assurances-vie, des crédits ou l'emploi ?

Le diagnostic présymptomatique : pour un encadrement des pratiques.

L'expérience des équipes pluridisciplinaires de diagnostic présymptomatique montre l'absolue nécessité :

- de délivrer une **information précise** sur le but, les limites et les perspectives du test et de laisser un temps de réflexion suffisant entre la demande de test génétique et sa réalisation
- que ce temps ne soit pas qu'un temps d'attente mais encore un **temps d'élaboration de la volonté de la personne**, aidée par le généticien, le clinicien spécialiste de la maladie et le psychologue selon un protocole type
- que, vigilants par rapport au **droit de savoir**, les praticiens n'en négligent pas pour autant la liberté de ne pas savoir
- de préserver la **confidentialité** des données obtenues.

Médecine personnalisée : médecine de demain ?

Le meilleur argument de promotion des tests de susceptibilité est l'annonce de l'avènement d'une médecine personnalisée. Selon ce modèle, chacun, informé de ses fragilités constitutionnelles, pourrait en sujet conscient et responsable, organiser sa vie. Cependant, ce modèle oublie de prendre en compte le fait que les comportements humains ne se laissent jamais enfermer dans une logique mathématique. Il n'est que d'observer les résistances et les phénomènes d'évitement que rencontre toute campagne de prévention – prévention routière, lutte contre le tabagisme ou information sur les maladies sexuellement transmissibles – pour imaginer que, face à des risques prévisibles, les comportements dits « rationnels » ne seront pas forcément la règle.

Nous ne pouvons donc qu'interroger ce modèle construit sur deux incertitudes. Sera-t-on un jour capable de calculer avec précision des risques individuels pour les maladies communes ? Les personnes à risque changeront-elles leurs comportements en conséquence, de façon raisonnée et sur le long terme ?

Dans un avenir proche, ces questions vont sans doute se complexifier :

- du fait du développement, devenu techniquement possible et à moindre frais, de tests génétiques explorant tout ou partie des génomes individuels
- du fait d'une industrialisation et d'une privatisation des laboratoires ainsi que de la mise à disposition, via les nouveaux outils d'information et de communication, de ces tests prédictifs
- en cas d'extension de l'usage des tests prédictifs, en particulier en période néonatale, prénatale voire préimplantatoire, ou en dehors du champ strictement médical.

V ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- Bonneau D, et al. : Les tests génétiques à l'heure de la révision des lois de bioéthique. Pathol Biol (Paris) (2009)
- JF Mattei, JR Harlé, P Le Coz, P Malzac : Questions d'éthique biomédicale. Ouvrage collaboratif, Flammarion (coll. NBS), Paris, 2008, 489 pages pages ; dont les chapitres suivants : Malzac P : Débat éthique, pluridisciplinarité et aide à la décision: pp. 175-184 Mattei JF, Malzac P : Le diagnostic prénatal : pp. 198-215 Mattei JF, Malzac P : Le diagnostic préimplantatoire : pp. 216-225 Malzac P, Philip : Le conseil génétique et sa dimension familiale : pp. 239-249 Malzac P : La médecine prédictive : pp. 250-259

RECOMMANDATION

- Bilans d'activité en génétique : <http://www.agence-biomedecine.fr>
- Loi de bioéthique édictée en 1994, révisée en août 2004 puis en juillet 2011 : <http://www.legifrance.gouv.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. 27.XI.2008. : <http://www.coe.int>
- Rapport d'information n° 2235 enregistré à la Présidence de l'Assemblée Nationale le 20 janvier 2010, fait au nom de la mission d'information sur la révision des lois de bioéthique ▶Président M. Alain CLAYES, Rapporteur M. Jean LEONETTI. Tome 2 : Sommaire des auditions : 1170 pages. : http://www.assemblee-nationale.fr/13/liste/rapport_information1.asp

Caryotype humain : Technique - Indications

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Dr Cédric Le Caignec

Service de génétique médicale, CHU Nantes, France

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Techniques conventionnelles du caryotype constitutionnel.....	3
I.1	Etape de culture des cellules.....	3
I.2	Obtenir des métaphases nombreuses et de bonne qualité.....	3
I.3	Identifier les chromosomes.....	4
I.3.1	Les techniques classiques, utilisées en routine.....	4
I.3.2	Les techniques spécifiques.....	4
I.3.3	Les techniques de haute résolution.....	4
II	Description du caryotype humain.....	5
II.1	Le chromosome métaphasique.....	5
II.2	La classification des chromosomes.....	5
III	Indications du caryotype constitutionnel.....	6
III.1	En période anténatale.....	6
III.2	En période postnatale.....	6
III.2.1	Patient présentant	6
III.2.2	Couple présentant un trouble de la fertilité ou des avortements spontanés à répétition.....	8
III.2.3	Devant un remaniement de structure familial connu.....	8

I TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL

Le caryotype est une technique qui permet l'étude des chromosomes d'un individu. Cette technique permet d'obtenir une image, en microscopie optique, des chromosomes d'une cellule au cours de la métaphase ou de la prométaphase de la mitose. En génétique médicale, le caryotype contribue à la mise en évidence de remaniements chromosomiques équilibrés ou déséquilibrés. La résolution d'un caryotype standard est celle d'une bande chromosomique, soit environ 5 à 10 millions de paires de bases (mégabases).

I.1 ETAPE DE CULTURE DES CELLULES

Tout prélèvement dont les cellules sont en division *in vitro* permet l'établissement d'un caryotype. Un prélèvement de sang veineux périphérique recueilli stérilement sur tube héparinate de lithium est le plus souvent utilisé pour réaliser un caryotype constitutionnel en période postnatale. Le sang total est incubé 48 à 72 heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (phytohémagglutinine ou PHA) permettant une stimulation de la croissance des lymphocytes T. Les fibroblastes de la peau sont également couramment utilisés en période postnatale mais demandent une culture cellulaire de une à trois semaines. Le fragment tissulaire est recueilli dans un milieu de culture stérile additionné d'antibiotiques.

En période anténatale, les amniocytes du liquide amniotique, les cellules trophoblastiques des villosités chorales ou les lymphocytes du sang fœtal sont utilisés. Le temps de culture est variable selon le type de cellule analysé. L'établissement d'un caryotype à partir de liquide amniotique nécessite, en moyenne, un temps de culture de 6 à 10 jours. Le temps de culture peut être plus long, parfois de plusieurs semaines, en raison de la faible quantité de cellules initiales en cas d'amniocentèse très précoce ou en raison des nombreuses cellules en apoptose et des débris cellulaires en cas d'amniocentèse tardive.

I.2 OBTENIR DES MÉTAPHASES NOMBREUSES ET DE BONNE QUALITÉ

Après la phase de multiplication des cellules, celles-ci sont bloquées au stade de métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour se faire, on ajoute de la colchicine, produit dérivé du colchique. Cette substance empêche la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique. La mitose est bloquée au stade de métaphase.

On procède ensuite au choc hypotonique. Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées. Les constituants cellulaires sont ensuite fixés grâce à un fixateur, par exemple un mélange acide acétique méthanol. Les

cellules sont alors prêtes à être étalées. On laisse tomber quelques gouttes de cette préparation sur une lame de verre. Le fait de faire tomber la suspension cellulaire fait éclater les membranes fragilisées, libérant ainsi les chromosomes qui restent toutefois groupés. Les lames sont ensuite observées en microscopie optique.

I.3 IDENTIFIER LES CHROMOSOMES

I.3.1 Les techniques classiques, utilisées en routine

Une simple coloration au Giemsa permet de compter et de classer les chromosomes en fonction de leur taille et de leur indice centromérique.

Les méthodes de marquage ou *banding* révèlent le long des chromosomes une alternance de bandes transversales, faiblement ou fortement colorées, dont la disposition topographique est spécifique de chaque paire chromosomique. Les bandes G (GTG) obtenues par dénaturation enzymatique et les bandes R (RHG) par dénaturation thermique ont chacune un contenu spécifique en ADN. Ces deux marquages, en contretypage, sont complémentaires. Lorsque l'on a une bande sombre avec l'une des techniques, avec l'autre on obtient une bande claire. Le marquage révèle l'euchromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement transcrit et l'hétérochromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement inactif. Un marquage en bandes G ou R permet de visualiser 300 à 600 bandes par lot haploïde de chromosomes.

I.3.2 Les techniques spécifiques

Quelques colorations sont spécifiques de segments chromosomiques précis: les bandes C pour l'hétérochromatine constitutive (centromères et constriction secondaires), l'imprégnation argentique pour les organisateurs nucléolaires (régions contenant les gènes des ARN ribosomiques ou NOR). Les bandes Q (QFQ) par coloration à la quinacrine et observation en fluorescence, sont superposables aux bandes G et colorent intensément la partie distale, hétérochromatique, des bras longs de l'Y, certains centromères et certains bras courts des acrocentriques.

I.3.3 Les techniques de haute résolution

L'étude des cellules en prométaphase (fin de prophase ou début de métaphase) par synchronisation des cultures associée à l'incorporation d'analogues de bases (bromodésoxyuridine ou BrdU) qui modifient les propriétés tinctoriales des bandes chromosomiques, permet d'améliorer la résolution du caryotype et d'observer 600 à 800 bandes par lot haploïde de chromosomes. Des remaniements chromosomiques plus fins peuvent être observés mais l'interprétation est délicate et plus efficace si elle est focalisée

sur un chromosome ou une région chromosomique donnée. Cette technique de haute résolution est de plus en plus remplacée par l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA).

II DESCRIPTION DU CARYOTYPE HUMAIN

II.1 LE CHROMOSOME MÉTAPHASIQUE

Il est constitué de deux chromatides sœurs réunies par un centromère dont la position définit les bras courts ou p et les bras longs ou q. L'indice centromérique ($p/p+q$) permet de distinguer les chromosomes métacentriques, submétacentriques et acrocentriques. Les chromosomes métacentriques ont un bras court et un bras long dont la taille est assez proche à la différence des chromosomes submétacentriques pour lesquels la taille du bras court est nettement inférieure à celle du bras long. Les chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) ont un centromère très distal, les bras courts sont très réduits, surmontés de tiges (organiseurs nucléolaires) porteuses de satellites. Les chromosomes acrocentriques sont impliqués dans les translocations Robertsoniennes. Les télomères sont les extrémités distales des chromosomes.

Le nombre et la morphologie générale des chromosomes sont les mêmes pour tous les individus. Cependant, les régions d'hétérochromatine peuvent être le site de variations inter-individuelles, sans conséquences phénotypiques. Ces polymorphismes chromosomiques portent souvent sur la longueur de l'hétérochromatine des bras longs de l'Y, des régions centromériques des chromosomes 1, 9 et 16 et sur les bras courts des acrocentriques.

II.2 LA CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES

Le caryotype humain comporte 46 chromosomes, soit 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes: en général, deux chromosomes X dans le sexe féminin ; un X et un Y dans le sexe masculin. Le caryotype normal s'écrit : 46,XX ou 46,XY. Attention, il existe des situations particulières. Un phénotype féminin peut être observé en association avec un caryotype 46,XY, par exemple en cas de mutation du gène *SRY*.

Les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante et leur indice centromérique. Les techniques de marquage en bandes aident à identifier chaque paire chromosomique par le motif des bandes claires et sombres. Les bandes sont répertoriées dans une nomenclature internationale. Chaque bras chromosomique est divisé, selon sa taille, en une à quatre régions; chaque région en bandes numérotées du centromère au télomère. Par exemple, la dénomination 6p12 désigne la deuxième bande de la région 1 des bras courts du chromosome 6.

III INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL

Il convient de distinguer les indications du caryotype en période anténatale et en période postnatale.

III.1 EN PÉRIODE ANTÉNATALE

Le caryotype est l'examen de référence lorsqu'une anomalie chromosomique est suspectée en période anténatale. Les indications sont variées :

- risque combiné du premier trimestre ou risque séquentiel intégré du deuxième trimestre supérieur ou égal à 1/250 (risque qui prend en compte l'âge maternel, les marqueurs sériques maternels du premier ou deuxième trimestre et la clarté nucale mesurée à l'échographie de 12 SA),
- signe(s) d'appel échographique,
- antécédent familial de déséquilibre chromosomique et /ou parent porteur d'un remaniement chromosomique équilibré (translocation réciproque, translocation Robertsonienne, inversion...).
- diagnostic de sexe.

III.2 EN PÉRIODE POSTNATALE

III.2.1 Patient présentant

- *phénotype évocateur d'un syndrome chromosomique connu*

Le caryotype est proposé en première intention devant une association de signes suggérant fortement un syndrome chromosomique connu (par exemples : trisomie 21, syndrome de Turner, syndrome de Klinefelter...).

Jusqu'à récemment, le caryotype était un élément essentiel du bilan d'un patient présentant une déficience intellectuelle associée ou non à une dysmorphie faciale, à une ou des malformations congénitales, à un trouble envahissant du développement. Il permettait la détection d'un déséquilibre chromosomique, délétion ou duplication. Les développements récents des puces à ADN génomique ont modifié les indications du caryotype dans l'exploration de la déficience intellectuelle. Des déséquilibres de beaucoup plus petite taille peuvent être mis en évidence augmentant considérablement le niveau de résolution comparé à ce qui peut être obtenu grâce à un caryotype standard.

Lorsque le phénotype du patient n'est pas cliniquement reconnaissable, l'ACPA est de plus

en plus proposée en première intention en remplacement du caryotype standard. Le caryotype vient cependant en complément de l'ACPA dans au moins deux situations : (1) Si une délétion ou une duplication chromosomique de novo est identifiée par puce à ADN, il est important de réaliser les caryotypes parentaux. En effet, l'un des parents peut être porteur d'une insertion chromosomique. Dans ce cas, le caryotype parental est équilibré mais, chez l'un d'eux, la région chromosomique délétée ou dupliquée chez l'enfant est insérée ailleurs sur le génome. Le risque de transmettre à nouveau cette délétion ou cette duplication est proche de 50%. Si le déséquilibre est de trop petite taille pour être visible grâce à un caryotype standard, une hybridation in situ en fluorescence sur métaphases est indiquée afin de localiser la région chromosomique sur le génome ; (2) La suspicion chez un patient d'un dérivé de translocation réciproque par puce à ADN génomique nécessite la réalisation du caryotype de l'enfant et de ses parents. Un dérivé de translocation est suspecté sur une puce à ADN lorsque la partie terminale d'un chromosome est délétée et que la partie terminale d'un autre chromosome est dupliquée. Un dérivé de translocation réciproque peut être le résultat d'une translocation réciproque parentale équilibrée. Cette information est importante en conseil génétique en raison du risque de récurrence non négligeable.

- *une hypotonie néonatale avec dysmorphie*
- *un retard de croissance intra-utérin associé à une dysmorphie ou à une anomalie neurologique*
- *une anomalie de la différenciation sexuelle (ADS)*

Une ADS observée à la naissance peut justifier la réalisation d'un caryotype constitutionnel. Il permet de déterminer la formule gonosomique, XY ou XX, et ainsi d'orienter le choix du sexe civil donné à l'enfant

- *un retard de croissance*

A tout âge, un caryotype peut être demandé devant un retard de croissance. Lorsque le retard de croissance est isolé, la recherche d'une délétion de l'ensemble ou d'une partie (i.e. un ou plusieurs exons) du gène SHOX par une technique ciblée de génétique moléculaire, par exemple PCR quantitative, est de plus en plus utilisée en complément ou remplacement du caryotype

- *un retard ou une absence de puberté*
- *une aménorrhée primaire ou secondaire, une ménopause précoce*
- *une association de signes cliniques évocateurs d'un syndrome microdélétionnel ou microduplicationnel*

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) réalisée grâce à une sonde spécifique de la région chromosomique donnée vient en complément du caryotype

- *une suspicion d'un syndrome d'instabilité chromosomique*

III.2.2 Couple présentant un trouble de la fertilité ou des avortements spontanés à répétition

A la différence des puces à ADN, le caryotype permet de visualiser la morphologie des chromosomes et ainsi la mise en évidence des remaniements chromosomiques équilibrés. Le caryotype est par conséquent essentiel au bilan réalisé dans le cadre de troubles de la fertilité (azoospermie ou oligospermie sévère) ou d'avortements spontanés à répétition. Il permet la détection d'une translocation réciproque ou Robertsonienne parentale équilibrée. A ce jour, les puces à ADN ne permettent pas de répondre à cette question.

III.2.3 Devant un remaniement de structure familial connu

Lorsqu'un remaniement de structure est connu au sein d'une famille (translocation réciproque ou Robertsonienne), le caryotype est indiqué chez toute personne à risque d'être porteuse du remaniement chromosomique à l'état équilibré. Si la translocation implique des fragments chromosomiques de grande taille, le caryotype peut suffire au diagnostic. En revanche, si les fragments chromosomiques sont de petite taille, la FISH peut être indiquée en complément du caryotype.

Le caryotype est également un examen essentiel au diagnostic et à la caractérisation de pathologies acquises dont les hémopathies et les tumeurs solides. Nous ne détaillerons pas ces indications qui ne relèvent pas de la cytogénétique constitutionnelle.

Remerciements :

Je remercie tout particulièrement le Dr Philippe Piloquet, le Dr Claire Bénéteau et le Pr Damien Sanlaville pour leur lecture critique. Le guide des bonnes pratiques en cytogénétique édité par l'ACLF a été consulté pour établir les indications du caryotype constitutionnel.

Cytogénétique moléculaire

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Serge Romana, Valérie Malan

Service d'Histo-Embryo-Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Cytogénétique moléculaire, aspects techniques.....	5
I.1	L'hybridation in situ fluorescente ou FISH (Fluorescence in situ hybridization).....	5
I.1.1	Un peu d'histoire.....	5
I.1.2	Les sondes.....	5
I.1.3	Le marquage.....	7
I.1.3.1	Principe général.....	7
I.1.3.2	Les fluorochromes.....	7
I.1.3.3	La multifuorescence.....	7
I.2	L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH Array.....	11
I.2.1	Un peu d'histoire.....	11
I.2.2	Principe.....	12
I.2.3	Une variante : les puces à SNPs (figure 7).....	13
II	Cytogénétique moléculaire, applications cliniques.....	14
II.1	LA FISH.....	14
II.1.1	La FISH sur métaphase : un complément du caryotype.....	14
II.1.1.1	Le Diagnostic cytogénétique des syndromes microdélétionnels	14
II.1.1.2	Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes.....	15
II.1.1.3	Caractérisation d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype.....	15
II.1.1.4	Détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées.....	15
II.1.2	La FISH interphasique.....	15
II.1.2.1	Le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques.....	16
II.1.2.2	Le Diagnostic pré-implantatoire des anomalies chromosomiques (DPI).....	16
II.1.2.3	La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans hémopathies malignes	16

II.1.2.4 Le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires.....	17
II.2 LA CGH ARRAY.....	17
II.2.1 La CGH array, technique de recherche clinique en pathologie acquise.....	17
II.2.2 La CGH array : technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles.	17
II.2.2.1 Les indications de la CGH array	18
II.2.2.2 Comment interpréter une CGH array ?.....	18
II.2.2.2.1 Classification des CNVs (19) (20).....	19
II.2.2.2.2 Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents.....	20
II.2.2.2.3 Utilisation des bases de données de variants de structure du génome.....	21
II.2.3 CGH array et recherche clinique en pathologie constitutionnelle.....	21
II.2.4 Limites de la CGH array.....	21
NOTE(S) DU CHAPITRE	22
III La nouvelle cytogénétique.....	22
IV Annexes.....	23

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'hybridation génomique sur réseau d'ADN ou CGH array qui est l'aboutissement du développement des techniques de cytogénétique moléculaire dont le début remonte aux années 80. La CGH array détecte des déséquilibres génomiques avec une résolution 10 à 500 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 d'un segment chromosomique remanié peut être déterminée 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 MC mais aussi chez des patients avec des pathologies psychiatriques ou neurologiques 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 la CGH array, pour le diagnostic des anomalies chromosomiques est plus limité. En effet, les anomalies chromosomiques qui leur sont associées, sont d'une part souvent équilibrées (la CGH ne détecte que les déséquilibres génomiques) 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, la CGH array 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.

I CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE, ASPECTS TECHNIQUES

I.1 L'HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE OU FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)

I.1.1 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 la 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 anti-biotine 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.

I.1.2 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 chromosomiques ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée.

On distingue :

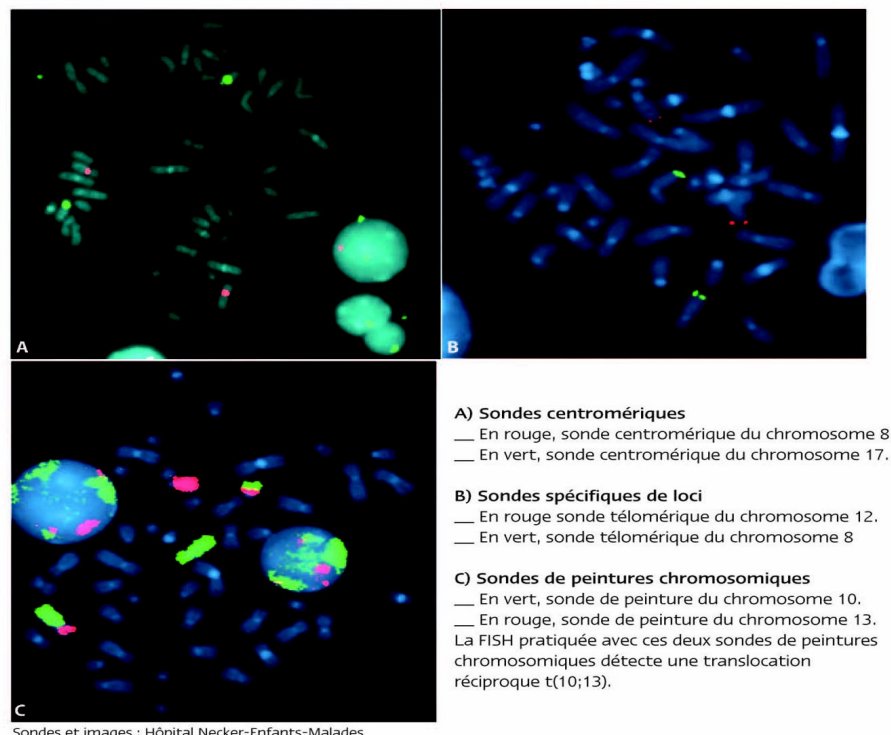
- **Les sondes composées de séquences spécifiques d'ADN répété.** Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilobase), mais s'hybrident sur des séquences spécifiques (centromères par exemple) répétées en tandem sur plusieurs

centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité (figure 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 (figure 1b et 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 BACs (« chromosomes artificiels de bactéries »). Ces BACs 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 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 ou YACs).
 - **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).

Figure 1 : Les sondes

Figure 1



Sondes et images : Hôpital Necker-Enfants-Malades

I.1.3 Le marquage

I.1.3.1 Principe général

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance 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 connues sont le *Random-priming* et la *Nick-translation*.

I.1.3.2 Les fluorochromes

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 :

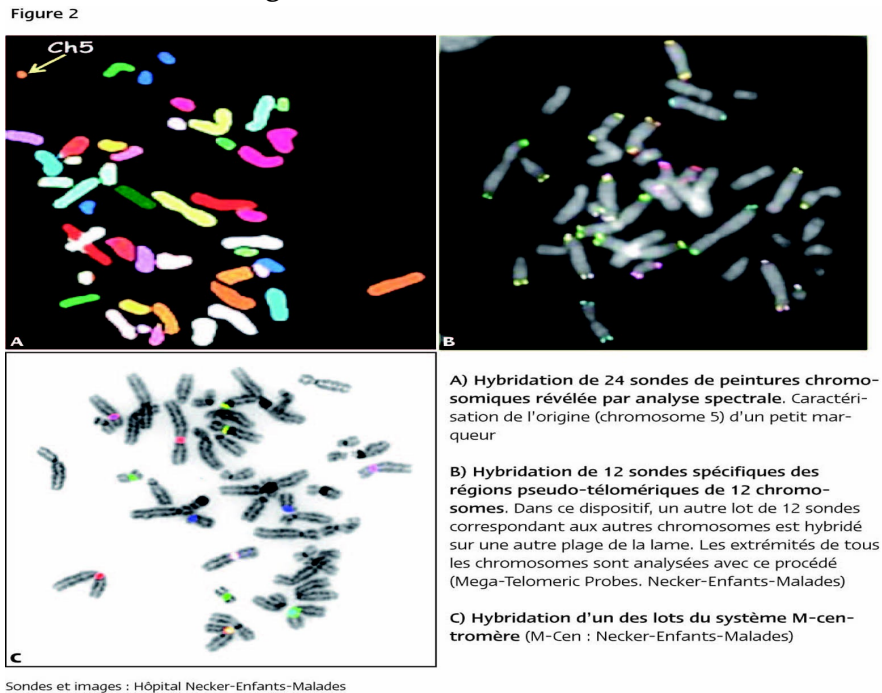
- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm - 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (λ_{exc} 495nm - λ_{em} 519nm) fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495nm - λ_{em} 519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red (λ_{exc} 589nm - λ_{em} 615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 (λ_{exc} 650nm - λ_{em} 670nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5.5 (λ_{exc} 675nm - λ_{em} 694nm) fluoresce dans le rouge

I.1.3.3 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 (voir paragraphe e.i). En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes de peinture, chacune spécifique d'une paire chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multifuorescence (**figure2a**). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère (**figure2b et 2c**).

Figure 2 : La multifuorescence



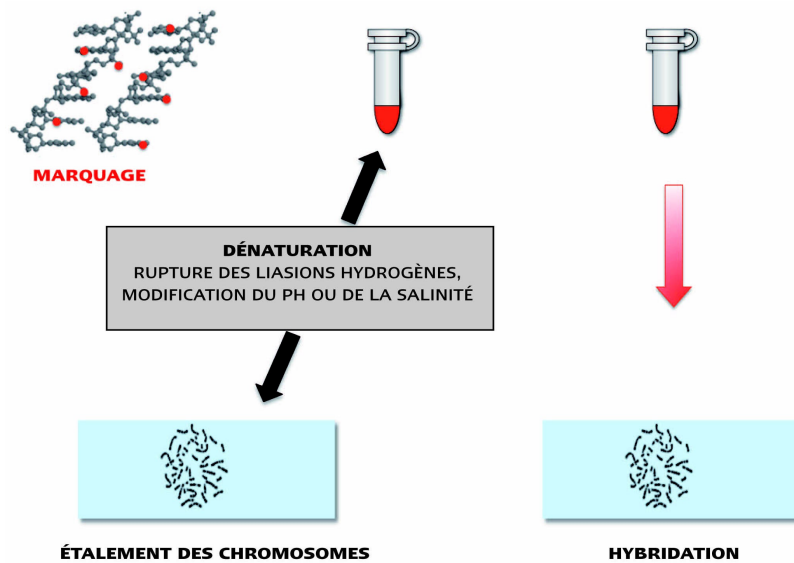
a) L'hybridation (figure 3)

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 40% 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).

Figure 3 : L'hybridation



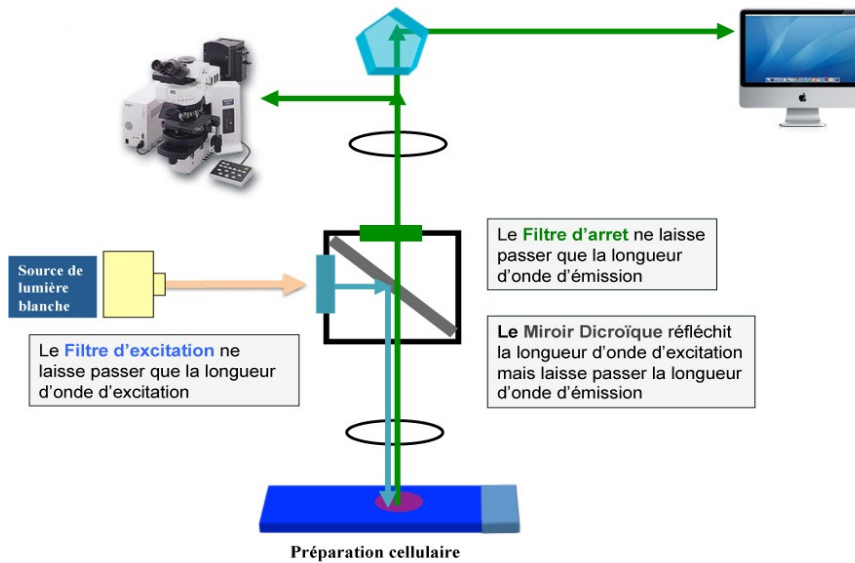
b) La microscopie en épifluorescence

Principe général

La figure 4 illustre la microscopie en épifluorescence. Un rayon lumineux de lumière blanche (contenant l'ensemble des longueurs d'onde de l'ultra violet 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 au 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 au niveau d'une caméra qui numérise ce signal. En changeant de filtres, on peut alors étudier de cette façon plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents.

Figure 4 : La microscopie en épifluorescence



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)

c) La limite de la technique de FISCH

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 1,5Mb pour la détection des translocations télomériques. En

cas d'insertion chromosomique, elles ne permettent pas de déterminer la région chromosomique impliquée. Enfin, elle ne sont pas d'une grande utilité pour la détection des duplications.

I.2 L'HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE SUR RÉSEAU D'ADN OU CGH ARRAY

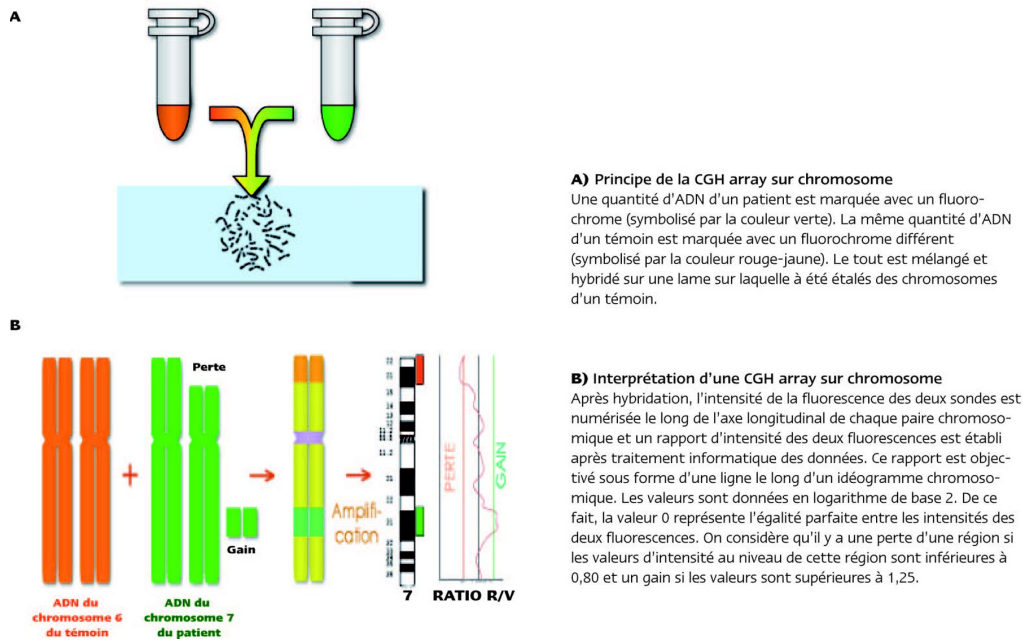
I.2.1 Un peu d'histoire

En 1992, l'équipe de Dan Pinkel mit au point une nouvelle technique de cytogénétique appelée hybridation génomique comparative (CGH) (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 (**figure 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 mis 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) proposent 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 !

Figure 5: Principe de la CGH sur chromosome



I.2.2 Principe

À la fin des années 90, ces auteurs démontrent qu'il est 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 ») sont déposées 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 (**figure 6**). L'ensemble des « points » est placé sur un idéogramme pour 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 3000 clones 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 avait une résolution moyenne d'une mégabase, soit 5 fois celle d'un caryotype en haute résolution. Ishkanian et al. (9) en utilisant 32 433 BACs chevauchants sur tout le génome ont

pu obtenir une puce avec une résolution de l'ordre de 30 kb.

Depuis le milieu des années 2000, les puces à oligonucléotides firent leur apparition. Il s'agit de lames sur lesquelles sont fixés des oligonucléotides 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 d'environ mille paires de base. 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. Parce que la CGH est 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 Variant* » ou en français « Variation de Nombre de Copies ».

I.2.3 Une variante : les puces à SNPs (figure 7)

Il est possible de fixer sur les lames, des oligonucléotides contenant des « *Single Nucleotide Polymorphisms* » ou SNPs. Ce sont des variations portant sur une seule paire de base, et distribuées uniformément dans le génome humain. On estime le nombre de SNPs à plus de 10 millions avec une répartition d'un SNP tous les 100 à 1000 paires de bases (1kb). La carte des SNPs étant établie, différents procédés ont été mis au point pour synthétiser des oligonucléotides contenant pour un locus donné les 2 allèles du SNP. L'avantage de l'utilisation de ces puces dites puces à SNPs 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. Celle-ci aura une signification lorsqu'elle impliquera plusieurs sondes adjacentes.

Ces puces ont initialement été développées à des fins d'haplotypage et d'analyse de liaison. Cependant, elles donnent 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, (<http://www.renapa.univ-montp1.fr>)) désigne aussi bien la technique de CGH array que celle des puces à SNPs.

II CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE, APPLICATIONS CLINIQUES

II.1 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, 5Mb), 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 précis c'est-à-dire au niveau moléculaire. L'utilisation de la FISH sur des métaphases et sur des noyaux a permis de dépasser certaines de ces limites.

II.1.1 La FISH sur métaphase : un complément du caryotype

II.1.1.1 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 (500kb) 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, n'a pu être identifiée que grâce à la découverte de translocations ou autres remaniements visibles sur le caryotype standard permettant de cibler une région précise¹ (*cf.note : Note*). Avec des sondes des régions impliquées utilisées en FISH, il est possible de les diagnostiquer si le tableau clinique est évocateur.

L'exemple le plus connu est celui du syndrome de DiGeorge/vélo-cardio-facial (DGS/VCF) (**figure 6a**), correspondant à une délétion d'environ 3 Mb dans la sous-bande 22q11.2 (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 réalisés pour rechercher une délétion 22q11.2 sont positives et 0,5% pour la délétion 22q13 (qui est associée au syndrome de Phelan-MacDermid). 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.

II.1.1.2 Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes

La majorité des anomalies chromosomiques de structure impliquées dans la pathogénèse 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 **figure 6b**.

II.1.1.3 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 multifuorescence (SKY ou M-FISH) sont particulièrement indiquées (**figure 6c**).

II.1.1.4 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. C'est fut le cas lors de la découverte de la translocation la plus fréquente associée aux leucémies aiguës lymphoblastique de la lignée B de l'enfant : la $t(12.21)(p13;q21)$ (2)

II.1.2 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) peuvent être ainsi étudiées. 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 aneuploïdies, le diagnostic pré-implantatoire et celui des anomalies chromosomiques associées aux cancers.

II.1.2.1 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 cultivées 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 aneuploïdie impliquant ces 3 chromosomes (**figure 7a**).

II.1.2.2 Le Diagnostic pré-implantatoire des anomalies chromosomiques (DPI)

L'une des applications les plus spectaculaires de la FISH est certainement le diagnostic pré-implantatoire 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 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 3 sondes télomériques, dont deux spécifiques des télomères des segments chromosomiques transloqués. Comme le montre la **figure 7b**, l'étude du nombre de signaux après hybridation de ces sondes sur les deux blastocystes prélevés permet de repérer les embryons sans déséquilibre chromosomique.

II.1.2.3 La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans 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 paragraphe iii) peuvent facilement être recherchés sur noyaux en interphase comme le montre la **figure 6b**. 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, et *ATM* et du locus 13q14 ainsi que la trisomie 12, anomalies dont dépend le pronostic.

II.1.2.4 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. La **figure 7c** montre la détection d'un remaniement du gène *cMYC* sur des coupes de ganglions d'un patient atteint d'un syndrome de Burkitt.

En résumé, la FISH sur métaphase est devenu 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.

II.2 LA CGH ARRAY

II.2.1 La CGH array, technique de recherche clinique en pathologie acquise

Les anomalies chromosomiques impliqués dans le diagnostic et le pronostic des cancers sont souvent équilibrés. Dans les hémopathies malignes, près de 400 anomalies chromosomiques récurrentes et équilibrées ont été rapportées. Pour ces raisons (anomalies équilibrées, mosaïcisme et anomalies ciblées), la CGH *array* n'est pas, en 2012, un examen de première intention pour le diagnostic cytogénétique de 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 l'acutisation des leucémies myéloïdes chroniques (13)

II.2.2 La CGH array : technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles.

À l'inverse des pathologies acquises, la CGH 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* (inversions ou translocations), ce sont les déséquilibres génomiques (gains ou pertes de matériel chromosomique) qui sont les principales causes chromosomiques de DI et/ou MC.

La CGH *array*, 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.

Tous ces éléments font qu'elle doit remplacer le caryotype dans les laboratoires de cytogénétique pour l'exploration des patients avec une DI et/ou MC.

II.2.2.1 Les indications de la CGH array

Chez les patients présentant une DI et/ou MC, la CGH *array* détecte 10 à 15% d'anomalies en plus de celles décelées par le caryotype (14). La plupart correspondent à des anomalies dispersées dans le génome et peu d'entre elles sont récurrentes. Les CNVs détectés sont en général associés à un phénotype d'autant plus sévère que la taille du déséquilibre chromosomique est grande et comprend de nombreux gènes. Le plus souvent, les CNV associés à une DI et/ou MC correspondent à des délétions (70% des cas). Par ailleurs, l'utilisation de la CGH *array* a révélé des déséquilibres génomiques associés à des pathologies psychiatriques et neurologiques. Par exemple, des délétions de 300 kb à 1Mb comprenant le locus du gène *CHRNA7*, localisé en 15q13, peuvent être associées à des épilepsies isolées (**figure 9**).

Dans ces pathologies, il existe une très grande variabilité phénotypique intra et inter familiale et une pénétrance incomplète. C'est ainsi que les délétions du gène *CHRNA7*, peuvent être responsables hormis l'épilepsie, de troubles psychiatriques (autisme, schizophrénie, troubles bipolaires), ou de déficience intellectuelle (15). Par ailleurs, des délétions en 16p11.2 d'une taille de 200 kb sont associées à une obésité alors que des duplications de cette même région sont associées à des retards de croissance et à des formes d'anorexie car elles impliquent le gène *SHB2* qui joue un rôle clé dans le contrôle cérébral des signaux qui régissent le stockage des graisses, l'utilisation de sucre, le bilan énergétique et le poids (16) (17). Ainsi, le champ de pathologies associées aux CNVs devient de plus en plus large.

Les indications de la CGH *array* dépassent donc largement aujourd'hui celles du caryotype. Elles concernent en plus des patients présentant une DI et/ou MC, ceux ayant des troubles neuropsychiatriques mais aussi dans certains cas, des anomalies cardiaques, rénales, squelettiques ou autres isolées.

II.2.2.2 Comment interpréter une CGH array ?

La signification d'un CNV identifié dans la pathogénèse du phénotype observé peut parfois être très difficile à établir. Certains CNVs 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.

II.2.2.2.1 Classification des CNVs (19) (20)

- **Les CNVs 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 CNVs considérés comme bénins (18). L'étude de ces CNVs 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 100kb) 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 CNVs sont retrouvées chez plus de 1% de la population, on parle de polymorphismes ou Copy Number Polymorphisms ou CNPs. S'ils sont présents dans moins de 1% de la population, on parle de « variants bénins privés ». La majorité de ces CNPs 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 (21) (22).

- **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 CNVs pathogènes cryptiques sont retrouvés dans environ 10 à 15% des cas. 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 1,5Mb, un CNV est quasiment toujours associés 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. Un exemple éloquent où il a été mis en évidence un CNV rare avec une pénétrance incomplète correspond au syndrome TAR (Thrombopénie et Absence de Radius). Cette pathologie associe une thrombopénie centrale et une absence bilatérale de radius. On note une grande variabilité phénotypique incluant, à des degrés divers, des anomalies cardiaques, gastro-intestinales, squelettiques et hématologiques. Par une approche CGH *array* Klopocki E and al. (23) ont mis en évidence une délétion 1q21 d'environ 200 kb chez tous les patients présentant un syndrome TAR. Cette délétion n'a pas été retrouvée chez 700 individus contrôles et n'est pas répertoriée dans la Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>). Cependant, environ 75% des parents sont porteurs de l'anomalie sans être atteints. Des facteurs

génétiques ainsi que des facteurs épigénétiques et environnementaux peuvent modifier la pénétrance et l'expressivité d'une pathologie génétique. Dans le syndrome TAR, la présence d'un ou de plusieurs gène(s) modificateur(s) 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**

Environ 10% des CNV soulèvent des difficultés d'interprétation. Ils correspondent le plus souvent à des duplications (70% des cas) d'une taille d'environ 700kb et 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. (24) 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). A 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.

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 (24).

Du fait de la difficulté d'interprétation de certains CNVs 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 doit être fournie aux parents. Le recueil d'un consentement spécifique en vue de la réalisation de cette analyse est nécessaire.

II.2.2.2.2 Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents

Il est toujours nécessaire de vérifier par une autre technique un CNV mis en évidence par CGH array. Il convient en effet d'exclure un faux positif (ce qui est aujourd'hui rare avec les puces à oligonucléotides) mais surtout de déterminer le mécanisme chromosomique sous-jacent 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 (**figure 8**). On peut utiliser des techniques de biologie moléculaire (qPCR, QMPSF..., 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 sont caractères *de novo* ou non.

II.2.2.2.3 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.

II.2.3 CGH array 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 voir 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 cognitif. En effet, des mutations dans ce gène ont été mises en évidence chez des patients avec une déficience intellectuelle sévère (25).

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 été ainsi décrits cliniquement comme la délétion 17q21.31 (26).

II.2.4 Limites de la CGH array

Contrairement au caryotype la CGH *array* 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 (27). 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.

NOTE(S) DU CHAPITRE

Note : La récurrence de certains de ces remaniements est liée à l'architecture du génome car ils sont médiés par des structures génomiques appelées duplions ou LCRs (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). Ainsi, la région comprise entre deux duplions 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 duplions. Ces remaniements sont appelés « désordre génomique », terme introduit par Lupski en 1998 pour désigner les pathologies qui résultent de ce mécanisme par opposition aux mutations géniques. Actuellement, le terme de « désordre génomique » s'applique aussi à des pathologies associées à des délétions chromosomiques qui ne répondent pas au mécanisme de NAHR.

III LA NOUVELLE CYTOGÉNÉTIQUE

L'émergence de la CGH *array* 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 CGH *array* 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). 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.

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 CGH *array* 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 ».

Enfin, l'automatisation de la CGH *array* et l'arrivée du séquençage haut débit ouvrent la voie de l'étude des anomalies de structure du génome à haut débit. Cela nécessite une concentration des moyens technologiques d'autant qu'il est nécessaire de disposer d'une banque de sondes couvrant l'ensemble du génome pour la vérification et la caractérisation des anomalies par FISH. Cela suppose une organisation nationale de l'activité de cytogénétique avec l'existence de quelques plate-formes nationales en relation étroite avec les différents centres hospitaliers.

IV ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- (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 Nov;78(11):6633-7.
- (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 prenatal 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 Jul;9(7):489-99.
- (13) Charles G. Mullighan, M.D. et al. : Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2009 January 29; 360(5): 470-480.
- (14) 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.
- (15) 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 Mar;40(3):322-8.

- (16) Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A et al. : A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463, 671-675 (2010).
- (17) Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F et al. : Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature*. 2011 Aug 31;478(7367):97-102
- (18) Redon R, Ishikawa S, Fitch KR et al. : Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444:444-54
- (19) Perry G, Dominy N, Claw K et al. : Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet*. 2007 October ; 39(10): 1256-1260.
- (2) Romana SP, Le Coniat M, Berger R. : t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Mar;9(3):186-91.
- (20) Mamtani M, Anaya J-M, He W and SK Ahuja. : Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes and Immunity* (2010) 11, 155-160
- (21) 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
- (22) Sudmant P, Kitzman, J, Antonacci, F et al. : Diversity of Human Copy Number Variation and Multicopy Genes. *Science* 2010; 330 : 641 - 646
- (23) Klopocki E, Schulze H, Strauss G, et al. : Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; 80:232-40.
- (24) 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
- (25) 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 Oct;155A(10):2386-96.
- (26) 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
- (27) 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

- (3) Landegent JE, Jansen in de Wal N et al. : Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization.. Hum Genet. 1987 Dec;77(4):366-70.
- (4) Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. : Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet. 1996 Apr;12(4):368-75.
- (5) Schröck E, du Manoir S, Veldman T et al : Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.
- (6) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. : Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992 Oct 30;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 Dec;20(4):399-407.
- (8) Pinkel D, Se Graves R, Sudar D et al. : High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998 Oct;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 Mar;36(3):299-303. Epub 2004 Feb 15.

Aspects cliniques des anomalies des autosomes hors trisomie 21

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Anne Moncla

Département de Génétique médicale, Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Les Anomalies Autosomiques de Nombre.....	3
I.1 Les polyplœidies.....	3
I.2 Les Aneuploïdies.....	4
I.2.1 La trisomie 18 ou syndrome D’Edward.....	4
I.2.2 La Trisomie 13 ou Syndrome de Patau	5
I.3 La Trisomie 8 en mosaïque.....	5
II Les Anomalies Autosomiques de Structure	6
II.1 Les délétions.....	6
II.1.1 Délétion 4p ou Syndrome de Wolf-Hirschhorn.....	7
II.1.2 Délétion 5p ou maladie du Cri du Chat.....	8
II.2 Les chromosomes surnuméraires	9
II.2.1 le Syndrome de Pallister-Killian ou tétrasomie 12p.....	9
II.2.2 Chromosome 15 isodicentrique, ou, invdup(15).....	10
II.3 Chromosome 20 en anneau	11
III Annexes.....	13

Les anomalies chromosomiques constitutionnelles se divisent classiquement en anomalies de nombre et anomalies de structure.

I LES ANOMALIES AUTOSOMIQUES DE NOMBRE

Les anomalies de nombre sont réparties en deux groupes. Le premier groupe est représenté par les polyploïdies définies par un nombre global de chromosomes anormal et le second par les aneuploïdies qui ne concernent qu'une seule paire chromosomique. Ces dernières résultent le plus généralement d'une non-disjonction chromosomique.

I.1 LES POLYPLOÏDIES

Elles touchent le nombre global de chromosomes. C'est la présence dans la cellule de multiples (plus de deux, $>2N$) du nombre haploïde de chromosomes. La polyploïdie est l'accident de fécondation le plus fréquent dans l'espèce humaine (1 à 3% des ovules fécondés). Elles sont responsables de la majorité des avortements spontanés du premier trimestre de la grossesse. Certaines grossesses polyploïdes et en particulier chez l'homme les triploïdies et les tétraploïdies poursuivent leur évolution.

Triploïdie :

La cellule triploïde contient trois lots haploïdes de chromosome ($3N=23 \times 3=69$ chromosomes). Elle résulte de la fusion d'un gamète diploïde avec un gamète normal. Il existe deux types de triploïdie soit :

- par diandrie, le lot de chromosome surnuméraire est d'origine paternelle
- par digynie, le lot de chromosome surnuméraire est d'origine maternelle

Les grossesses triploïdes sont en général repérées en cours de grossesse en raison des signes d'appel dont les plus fréquents sont :

- Un retard de croissance intra-utérin sévère souvent léthal
- Une ventriculomégalie
- les malformations sont variables et multiples.

Quelques grossesses triploïdes aboutissent à la naissance d'enfants à terme mais leur survie est en règle très brève de quelques semaines de vie sauf dans les cas de mosaïques ($2N/3N$), le tableau clinique est moins sévère et la survie prolongée. La mosaïque peut être absente des lymphocytes nécessitant la réalisation d'un caryotype sur fibroblastes ou HIS frottis buccal. C'est un diagnostic rare qu'il faut savoir évoquer devant un retard de croissance sévère, une asymétrie corporelle et la présence d'une syndactylie entre les doigts 3 et 4.

Tétraploïdie :

La cellule tétraploïde contient quatre lots haploïdes de chromosome ($4N=23 \times 4=92$ chromosomes). La tétraploïdie reste extrêmement rare à la naissance et donne un syndrome très malformatif non viable à long terme associant un retard de croissance sévère, une microcéphalie, une dysmorphie faciale et des malformations congénitales.

I.2 LES ANEUPLOÏDIES

Les anomalies autosomiques observables à la naissance sont en dehors de la trisomie 21, les trisomies 13 et 18. En règle générale, elles sont libres et homogènes. Décrites en 1960, ce sont des anomalies extrêmement sévères et rapidement létales. Elles sont aujourd'hui en général diagnostiquées *in utero* en raison du tableau malformatif dépistable à l'échographie.

La probabilité pour un jeune médecin de les rencontrer est donc devenue faible.

I.2.1 La trisomie 18 ou syndrome D'Edward

Pour mémoire, le diagnostic de trisomie 18 est évoqué devant un nouveau né hypotrophique, hypertonique, présentant une microcéphalie avec saillie de l'occiput et une dysmorphie faciale associant un front fuyant, des oreilles bas implantées et pointues caractéristiques, « faunesques », une bouche petite avec un palais ogival, une micrognathie, des anomalies des membres : position du « suppliant » des bras, mains avec des doigts en flexion permanente, l'index recouvrant le 3e doigt, le 5e recouvrant le 4e, des pieds bots varus équin et en piolet.

Il existe un cortège de malformations viscérales, cardiaques, digestives (omphalocèle, hernies diaphragmatiques), rénales.

Figure 1 : La trisomie 18



I.2.2 La Trisomie 13 ou Syndrome de Patau

Elle est diagnostiquée devant un nouveau né hypotrophique présentant des malformations sévères du système nerveux central de type holoprosencéphalie due à un défaut de clivage du prosencéphale. Ces malformations sont constantes. Elles sont responsables d'anomalies médianes de la face avec une fente labiopalatine bilatérale ou « gueule de loup », des anomalies oculaires allant de la microphthalmie avec hypotélorisme jusqu'à la cyclopie. Il s'associe une microcéphalie avec aplasie cutanée du vertex, des anomalies des extrémités avec une hexadactylie uni ou bilatérale aux mains et aux pieds, des malformations viscérales cardiaques, digestives et uro-génitales.

La trisomie 13 est due dans la majorité des cas à un accident de non disjonction chromosomique. La deuxième cause est la malségrégation parentale d'une translocation robertsonienne impliquant le chromosome 13.

Lorsqu'elle est en mosaïque, la trisomie 13 peut entraîner des tableaux cliniques variables sur le plan malformatif et neurodéveloppemental. Il n'existe pas de corrélation entre le taux de la mosaïque et le pronostic vital ou mental, ce qui rend difficile le conseil génétique en cas de diagnostic prénatal de mosaïque.

Figure 2 : La trisomie 13



I.3 LA TRISOMIE 8 EN MOSAÏQUE

Ce tableau clinique mérite d'être reconnu à l'examen clinique car dans de rares cas, la mosaïque peut ne pas être présente dans les lymphocytes et confinée au niveau des cellules fibroblastiques. Dans ce cas, seul un caryotype sur biopsie cutanée ou une HIES sur frottis buccal peut de faire le diagnostic.

La trisomie 8 en mosaïque est reconnaissable cliniquement et associe un retard mental modéré avec une dysmorphie faciale particulière et des anomalies ostéoarticulaires.

- La dysmorphie faciale associe un front haut et saillant, le visage allongé, le nez est large, retroussé, la bouche grande avec une lèvre inférieure particulière, charnue et

éversée. Il existe très fréquemment un ptosis et strabisme oculaire. Le menton est petit en retrait avec une fossette mentonnière horizontale ; Les oreilles sont anormales avec un grand pavillon.

- Le cou est court large et les épaules étroites.
- Il existe de façon très constante des anomalies des extrémités ; les mains et pieds présentent camptodactylies, brachydactylies, pieds bots, hallux valgus. Des contractures en flexion apparaissent avec l'âge. Un signe très caractéristique est la présence de plis palmaires et plantaires très profonds donnant un aspect de plis capitonnés.

Le retard mental est modéré et ses enfants ont un comportement lent.

II LES ANOMALIES AUTOSOMIQUES DE STRUCTURE

Les anomalies de structure impliquent une ou plusieurs cassures chromosomiques suivies d'un recollement anormal. Elles peuvent affecter un, deux voir plusieurs chromosomes. Elles peuvent être équilibrées ou non équilibrées. Les différents types d'anomalies sont les délétions, les duplications, les chromosomes en anneau, les isochromosomes, les chromosomes surnuméraires (chromosome en anneau, isodicentrique) toujours déséquilibrés et les translocations, inversions et insertions généralement équilibrées. La malségrégation de ces dernières lors du processus méiotique peut conduire à l'apparition de formule déséquilibrée.

Elles ont été identifiées avec les premières techniques d'analyse chromosomique : le caryotype standard. Le degré de résolution est égal ou supérieur à 10 mégabases.

Nous nous intéresserons aux anomalies déséquilibrées qui ont toujours un retentissement phénotypique associant un retard mental, une dysmorphie faciale et des malformations viscérales diverses survenues de novo ou par malségrégation méiotique d'une anomalie équilibrée. Les anomalies de structure décrites sont extrêmement variées. Nous choisirons de décrire les aspects cliniques d'anomalies les plus connues et qui doivent être diagnostiquées cliniquement. Seront exclus les isochromosomes en raison de leur rareté pour les autosomes alors qu'ils sont fréquents pour le chromosome X et les duplications bien que nombreuses du fait de la difficulté de reconnaissance clinique.

II.1 LES DÉLÉTIONS

Nous avons choisi de décrire deux délétions très classiques décrites dès les débuts de la cytogénétique reconnaissables cliniquement. Il s'agit de la délétion de la région télomérique du bras court du chromosome 4 et de la région télomérique du bras court du chromosome 5.

La taille de la délétion est extrêmement variable. Les techniques de cytogénétique moléculaire ont permis de délimiter des régions minimales critiques et d'identifier les gènes candidats pour ces phénotypes. Lorsqu'elles sont de petite taille, ces délétions peuvent ne pas être identifiées sur un caryotype standard, justifiant la réalisation d'une technique de cytogénétique moléculaire ou d'une étude en CGH-array lorsque le diagnostic est évoqué sur des arguments cliniques.

II.1.1 Délétion 4p ou Syndrome de Wolf-Hirschhorn

Le syndrome du Wolf-Hirschhorn est une anomalie chromosomique résultant d'une délétion de taille variable de l'extrémité du bras court du chromosome 4 (4p-). Elle a été décrite en 1965 par Wolf et Hirschhorn indépendamment. Cette délétion survient de novo dans 85% des cas mais peut être héritée d'un remaniement parental équilibré. Son incidence à la naissance est comprise à 1/15 000 enfants nés vivants.

Il est cliniquement bien défini et reconnu dans la petite enfance. Les signes constants sont un retard de croissance sévère à début anténatal et une microcéphalie (< 3DS), associée à une dysmorphie faciale.

Cette dysmorphie faciale est très caractéristique. Elle évoque un casque de « guerrier grec » avec un front haut, un hypertélorisme, une hypoplasie orbitaire, une exophtalmie, la glabella est large avec parfois un hémangiome, les fentes palpébrales horizontales ou obliques en haut et en dehors, un nez aux bords rectilignes et parallèles, un philtrum court. Les anomalies oculaires sont fréquentes avec ptosis, strabisme, nystagmus ou phénomène de Marcus Gunn. La bouche est caractéristique avec une lèvre supérieure fine et des coins tombants, le menton petit. Une fente labiopalatine est fréquemment présente. Des anomalies dentaires sont fréquentes.

Le cou est long, le thorax allongé. Il existe des anomalies des extrémités avec un pouce digitalisé.

Les malformations associées les plus fréquentes sont une fente labiopalatine, des anomalies cardiaques et osseuses (scoliose).

Le retard mental est sévère avec un retard des acquisitions psychomotrices. La marche est acquise en moyenne à l'âge de 4 ans. Le langage reste très pauvre. Une surdité est aussi souvent signalée. Une épilepsie est présente chez 90% des patients. Elle débute chez le nourrisson et peut être sévère. Un aspect particulier du tracé EEG a été décrit.

Le phénotype clinique est plus difficile à reconnaître à l'âge adulte, la dysmorphie faciale étant moins caractéristique. Il a d'ailleurs été reporté sous le nom d'un autre syndrome ; le syndrome de Pitt-Rogers-Danks qui n'est autre que le tableau clinique de l'adulte présentant cette délétion.

Les analyses moléculaires des délétions variables de cette région ont permis d'identifier deux régions minimales critiques pour ce syndrome WHSCR-1 and WHSCR-2. Dans la

première région, 3 gènes ont été identifiés et proposés comme candidats, Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1Stec et 2Stec (WHSC1 et WHSC2), Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1). Une deuxième région a été décrite par Zollino et al, WHSCR2 plus distale. La question reste donc à résoudre mais le phénotype semble lié à l'haploinsuffisance de plusieurs gènes contigus.

Figure 3 : Délétion 4p



II.1.2 Délétion 5p ou maladie du Cri du Chat

Le syndrome du Cri du Chat est une anomalie chromosomique résultant d'une délétion de taille variable de l'extrémité du bras court du chromosome 5 (5p-). Cette délétion survient de novo dans 90% des cas mais peut être héritée d'un remaniement parental équilibré. L'incidence à la naissance est comprise de 1/15 000 et 1/50 000 enfants nés vivants.

Son tableau clinique classique est identifiable cliniquement à la naissance. Sa caractéristique clinique la plus remarquable est l'existence d'un cri chez le bébé monochromatique présent à la naissance, évoquant le miaulement d'un chat qui a donné son nom à cette maladie. Ce cri anormal est lié à une anomalie laryngé, il disparaît spontanément dans les premières semaines de vie. Ceci oriente vers la recherche des autres signes très évocateurs et constants: une microcéphalie associée à une dysmorphie faciale.

Elle associe une arête nasale large et plate, un hypertélorisme, un épicanthus, une micrognathie.

Ces enfants présentent un retard psychomoteur important. Les malformations sont rares.

A l'âge adulte, le retard mental est sévère. On note une absence de langage avec une compréhension qui semble meilleure. Ils ont une autonomie réduite. La dysmorphie à cet âge se modifie avec un allongement du visage et l'apparition d'un prognathisme.

Cette délétion est caractérisée par une taille très variable d'un patient à l'autre. Les analyses moléculaires ont permis de cartographier cette région chromosomique 5p. Les études de

corrélation génotype-phénotype ont montré une importante variabilité clinique et cytogénétique. Une région minimale critique a été établie contenant deux gènes, Semaphorine F (SEMAF) et d-catenine (CTNND2) qui sont potentiellement impliqués dans le développement cérébral. La délétion du gène de la télomérase reverse transcriptase (hTERT) localisé en 5p15.33 pourrait contribuer aux manifestations phénotypiques observées chez les patients.

II.2 LES CHROMOSOMES SURNUMÉRAIRES

II.2.1 le Syndrome de Pallister-Killian ou tétrasomie 12p

Le syndrome de Pallister-Killian est une anomalie chromosomique résultant de la présence d'un petit chromosome surnuméraire, formé de 2 copies des bras courts d'un chromosome 12, entraînant la présence de quatre copies de ce bras court. L'incidence annuelle est incertaine et estimée à environ 1/25 000. Cette anomalie a la particularité d'être présente en mosaïque. Une sélection cellulaire i(12p) a été observée in vitro et a aussi probablement lieu in vivo. Le caryotype est 47,XX ou XY,i(12)(p10)/ 46,XX ou XY. Cette mosaïque peut ne pas être mise en évidence dans les lymphocytes, l'anomalie étant alors confinée dans les cellules fibroblastiques. Un caryotype sur biopsie cutanée ou une HIS sur frottis buccal sera nécessaire pour établir le diagnostic. L'isochromosome est en général présent dans 30-100 % des métaphases de fibroblastes. L'hybridation in situ avec des sondes spécifiques de l'ADN du chromosome 12 est de règle aujourd'hui pour confirmer l'origine du chromosome.

L'isochromosome est, dans la plupart des cas, d'origine maternelle. Tous les cas rapportés sont sporadiques.

Le tableau clinique est suffisamment caractéristique pour être réalisé cliniquement dès la période néonatale. Le tableau clinique associe un retard psychomoteur avec une hypotonie et une dysmorphie faciale très caractéristique, un raccourcissement rhizomélique des membres, des mains et pieds petits avec une hypoplasie unguéale.

La dysmorphie faciale comprend des traits grossiers avec un profil aplati, un front haut avec une alopécie frontotemporale, des cils et sourcils clairsemés, des rebords supraorbitaires peu marqués, des fentes palpébrales obliques, un hypertélorisme, une racine de nez plate et élargie, un petit nez avec des narines antéversées, une grande bouche avec des coins bas et une lèvre supérieure proéminente. Avec l'âge, une macroglossie et un prognathisme apparaissent.

Le tableau neurologique est sévère avec une hypotonie marquée présente à la naissance. Des contractures se développent avec l'âge. Par la suite, le déficit intellectuel est très sévère avec une autonomie très réduite. Une épilepsie est fréquemment associée.

De nombreuses malformations congénitales peuvent être présentes, les plus spécifiques étant des anomalies diaphragmatiques et anales. Des anomalies cardiaques, en particulier des communications interventriculaires, sont présentes dans 25 % des cas. Des anomalies de pigmentation cutanée, une surdité sont des signes fréquents.

Certains patients avec un niveau de mosaïcisme plus faible sont cependant moins affectés. Ce tableau clinique peut être repéré pendant la grossesse du fait de l'expression des signes cliniques telles qu'une hernie diaphragmatique, un hydramnios, un hydrops fœtal, des malformations cardiaques ou des membres courts qui conduisent à réaliser une amniocentèse. Ces signes d'appel conduisent à la réalisation d'un caryotype fœtal qui permettra de révéler l'anomalie.

Figure 4 : le syndrome de Pallister-Killian



II.2.2 Chromosome 15 isodicentrique, ou, invdup(15)

La région chromosomique 15q11q13 est hautement instable et elle est le siège de remaniements génomiques récurrents, déterminant des syndromes cliniques définis, comme celui associé à la présence d'un marqueur chromosomique surnuméraire du à la duplication inversée du chromosome 15 proximal. Le syndrome de duplication inversée 15q11 (inv dup(15) ou syndrome du chromosome 15 isodicentrique (idic(15)), réalise une tétrasomie 15p et une tétrasomie partielle 15q. Le syndrome d'inv dup(15) est déterminé par les remaniements étendus contenant la région critique des syndromes de Prader-Willi/Angelman (PWS/AS). L'incidence estimée à la naissance est de 1/30 000. Le diagnostic repose sur l'analyse cytogénétique standard couplée aux techniques et l'hybridation fluorescente in situ interphasique (FISH), à l'aide de sondes DNA spécifiques du chromosome 15 proximal et de la région critique PWS/AS. L'origine parentale des dup15q11-q13 est très souvent maternelle. Les remaniements étendus avec inv dup(15) intéressant la région critique PWS/ASCR sont sporadiques.

Le tableau clinique est caractérisé par une symptomatologie neurologique sévère et peut-être évoqué cliniquement dans le groupe des enfants présentant une encéphalopathie épileptogène précoce.

Dès la période néonatale, l'enfant présente une hypotonie centrale avec une hyperextensibilité articulaire et une hypersialie. Un contact très pauvre avec l'entourage est remarqué dès cette période. Le retard psychomoteur devient très vite manifeste.

L'épilepsie est pratiquement constante. Elle se manifeste entre l'âge de 6 mois et 9 ans, sous diverses formes de crises souvent rebelles à la thérapeutique. Elle aggrave souvent le déficit intellectuel et a long terme peut être responsable d'une régression des acquisitions motrices. Le déficit intellectuel a comme caractéristique de s'accompagner de troubles autistiques. Le langage expressif est absent ou très pauvre, souvent écholalique. La compréhension est très limitée et contextuelle. L'intention de communiquer est absente ou très limitée. La dysmorphie faciale, quand elle existe, est discrète et les malformations majeures sont rares.

Les remaniements étendus avec inv dup(15) intéressant la région critique PWS/ASCR sont presque toujours sporadiques.

Figure 5 : Chromosome 15 isodicentrique



II.3 CHROMOSOME 20 EN ANNEAU

Le syndrome du chromosome 20 est une anomalie résultant de la formation d'un chromosome en anneau. C'est le plus fréquent des anneaux impliquant les autosomes. Il est associé à un tableau clinique identifiable.

Généralement, la constitution d'un anneau s'accompagne de la perte de matériel dans la région subtélomérique d'un ou des deux bras. Les chromosomes en anneau sont instables : au cours de la mitose, l'anneau peut se perdre, ou se dédoubler. Ainsi, les personnes possédant un chromosome en anneau ont un caryotype en mosaïque, avec des cellules normales, des cellules avec le chromosome en anneau, des cellules avec une monosomie,

et/ou des cellules avec des anneaux réorganisés ou dupliqués. La proportion de chaque type de cellules peut varier au cours du temps. En ce qui concerne cette anomalie, on distingue aujourd'hui deux groupes de patients ; le premier groupe on n'observe pas de perte des régions subtélomériques des bras courts ou longs et le deuxième groupe dans lequel une perte de la région subtélomérique du bras long et /ou du bras court est observé.

Cliniquement, le syndrome du chromosome 20 en anneau est essentiellement caractérisé par une épilepsie typique et sera reconnu par les médecins épiléptologues.

L'épilepsie se traduit par des crises partielles complexes, avec une progression fréquente vers des crises toniques ou tonico-cloniques généralisées. L'épilepsie est quasi systématiquement présente à l'âge de trois ans, mais peut se manifester dès la période néonatale. Les manifestations les plus typiques sont l'épilepsie du lobe frontal et les terreurs et hallucinations ictales. Les crises de panique débutent dans la petite enfance. Chez les jeunes enfants, un tracé d'EEG montrant une activité thêta rythmique à ondes lentes avec des pics apparaît sans manifestations cliniques concomitantes (épilepsie électrique inter-ictale). Il prédomine dans la zone frontale. Ces épisodes de mal épileptique non convulsif entraînent une dégradation cognitive progressive qui peut aboutir à un déficit intellectuel plus ou moins sévère. L'épilepsie associée au chromosome 20 en anneau est souvent partiellement ou totalement résistante aux traitements médicaux et chirurgicaux.

Il n'y a pas de dysmorphie caractéristique, bien que macrocéphalie, strabisme, micrognathie, fentes palpébrales anti-mongoloïdes, et anomalies des oreilles aient été rapportés chez certains patients. La croissance pré et post-natale est normale, comme l'est a priori le développement psychomoteur.

Le mécanisme responsable des crises d'épilepsie n'est pas connu, même s'il est possible que deux gènes d'épilepsie (CHRNA4 et KCNQ2) situés dans la région 20q subtélomérique soient impliqués dans la pathogenèse.

Figure 6 : Chromosome 20 en anneau



III ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- Cerruti P, Perfumo C, Cali A et al : Clinical and molecular characterization of 80 patients with 5p deletion:genotype-phenotype correlation. J Med Genet 2001,38:151-158. Conlin L, Kramer W, Hutchinson A, et al: Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients. J Med Genet;2011;48:1-9
- Conlin L, Kramer W, Hutchinson A : Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients: J Med Genet 2011;48:1-9
- Griffith CB, Vance GH, Weaver DD. : Phenotypic variability in trisomy 13 mosaicism: two new patients and literature review. Am J Med Genet A. 2009 Jun; 149A(6):1346-58
- Jean de Grouchy, Catherine Turleau. : « Atlas des maladies chromosomiques » Expansion Scientifique Française ; 2e édition-1982.
- Liehr T, Mrasek K, Weise A et al : Small supernumary marker chromosome-progress towards a genotype-phenotype correlation. Cytogenet Genome Res. 2006;112(1-2):23-34
- Rauch A, Schellmoser S, Kraus C, et al: : First know microdeletion with the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. Am J Med Genet 2001,99:338-342.
- Zollino M, Lecce R, Fischetto R et al : Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region WHSCR-2. Am J Hum Genet 2003,75:590-597.

Dysgonosomies X, XXY, XXX, XYY

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	45,X : syndrome de Turner.....	3
II	47,XXY : syndrome de Klinefelter.....	4
III	47,XXX.....	5
IV	47,XYY.....	5
V	Prise en charge des dysgonosomies en prénatal.....	6
VI	Annexes.....	7

INTRODUCTION

Les dysgonosomies qui seront traitées dans ce chapitre sont les anomalies de nombre des gonosomes X et Y. Ces anomalies ont beaucoup moins de répercussions sur le plan phénotypique que les aneuploïdies impliquant les autosomes, et sont la plupart du temps viables. Ceci provient du phénomène d'inactivation du chromosome X (un chromosome X actif unique dans chaque cellule somatique) et probablement du faible nombre de gènes sur le chromosome Y.

Le retentissement phénotypique implique selon les anomalies observées, la taille, puis moins fréquemment le langage et la fertilité.

Leur découverte en prénatal, le plus souvent fortuite, rend leur annonce difficile en conseil génétique.

I 45,X : SYNDROME DE TURNER

Fréquence : il concerne 0.4 pour mille nouveau-nés filles.

Il s'agit de filles présentant une petite taille associée à une insuffisance gonadique.

Signes cliniques : les circonstances de découverte du syndrome de Turner sont variables : en prénatal sur des signes échographiques : hygroma colli, anasarque ; à la naissance en cas de lymphœdème, de petite taille ; pendant l'enfance en cas de retard statural ; à l'adolescence en cas d'absence de puberté, d'aménorrhée primaire et de petite taille, et à l'âge adulte en cas de stérilité et de retard statural.

Cliniquement, on peut observer une petite taille (<1.50m), un pterygium colli, une implantation des cheveux en trident, des oreilles basses, un palais ogival, une micrognathie, un thorax large avec écartement exagéré des mamelons, un cubitus valgus, un genu valgum, des naevi pigmentaires, une brièveté du IV^{ème} métacarpien, une coarctation de l'aorte (25%), des reins en fer à cheval (50%), une dysgénésie gonadique avec des ovaires atrophiques (bandelettes fibreuses).

Les filles n'ont pas de retard mental, mais peuvent présenter des difficultés modérées dans les apprentissages, nécessitant un soutien scolaire.

Biologiquement, la FSH est élevée, le corpuscule de Barr est négatif.

Diagnostic cytogénétique : le syndrome de Turner est caractérisé par une formule chromosomique 45,X dans un peu plus de la moitié des cas. Dans les autres cas, la formule est en mosaïque avec une formule 46,XX, et/ou on observe une anomalie de structure d'un des deux chromosomes X (délétion, anneau). Très fréquent dans les produits de fausses

couches (90%), il est retrouvé à la naissance à une fréquence de un pour 2500 filles. Certaines anomalies de structure de l'X peuvent donner un retard mental en cas d'anneau de l'X de petite taille, ne possédant pas de centre d'inactivation, aboutissant à une disomie fonctionnelle délétère de l'X.

L'âge maternel n'influe pas sur la survenue de la formule 45,X.

Prise en charge et traitement : l'annonce diagnostique doit faire partie du processus de prise en charge globale au sein d'une équipe multidisciplinaire (endocrinologue, gynécologue).

Le traitement par hormone de croissance pendant l'enfance (en moyenne 2-4 ans) permet d'améliorer la taille adulte. L'induction de la puberté est le plus souvent nécessaire par de faibles doses d'œstrogènes et est suivie du traitement substitutif par œstroprogestatifs de l'insuffisance ovarienne. On doit assurer le dépistage et le traitement adapté des maladies associées éventuelles (déficit auditif, hypertension artérielle, endocrinopathies, diabète dyslipidémie et des complications cardiovasculaires à type de coarctation aortique) et des difficultés scolaires ou d'insertion socio-professionnelle éventuelles et informer sur l'existence d'une association de patients.

La découverte en prénatal d'une formule 45,X entraîne un conseil génétique particulièrement difficile. Les circonstances de découverte de l'anomalie vont orienter le discours du cytogénéticien (fortuitement ou après mise en évidence de malformations échographiques)

II 47,XXY : SYNDROME DE KLINEFELTER

Il s'agit de garçons ne présentant pas de phénotype particulier jusqu'à l'adolescence. La prévalence du syndrome de Klinefelter est de l'ordre de 1.5 p 1000 naissances garçons, certainement sous évaluée.

Cliniquement, les individus ont une grande taille (gène SHOX en triple exemplaire), peuvent présenter une gynécomastie, des petits testicules, une stérilité. Les caractères sexuels secondaires sont peu développés avec parfois une virilisation incomplète. Néanmoins, la sexualité est normale.

Ils n'ont pas de retard mental, mais peuvent présenter un retard de langage à type de dyslexie.

Biologiquement, il existe un hypogonadisme hypergonadotrophique, la FSH est élevée.

Diagnostic cytogénétique : la formule chromosomique est 47,XXY, elle peut être observée en mosaïque avec une population cellulaire normale 46,XY.

Prise en charge : elle comprend un traitement par testostérone au début de l'adolescence permettant un développement des caractères sexuels secondaires, une meilleure estime d'eux-mêmes. L'orthophonie est indiquée pour le retard de langage, la chirurgie pour la gynécomastie. Le recours à l'assistance médicale à la procréation (AMP) peut permettre de pallier dans certains cas à la stérilité.

L'annonce du diagnostic est délicate en conseil génétique, d'une affection qui n'est pas considérée comme d'une particulière gravité par les centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal. Le pourcentage d'IMG suite au diagnostic prénatal de syndrome de Klinefelter tend à diminuer.

III 47,XXX

Il s'agit de femmes de grande taille.

La prévalence est de l'ordre de 1 p 1000, mais seulement 10% de ces femmes sont diagnostiquées du fait d'un phénotype normal.

Cliniquement, du fait de l'inactivation incomplète du chromosome X et donc de la présence du gène *SHOX* en triple exemplaire, la croissance est précoce et on peut observer une grande taille à l'âge adulte.

Il n'existe pas de retard mental mais un retard de langage peut être observé nécessitant un soutien scolaire. Une faible estime de soi et une timidité sont fréquemment rencontrées. La fertilité est conservée et les enfants présentent dans la grande majorité des cas un caryotype normal.

Prise en charge : elle comprend une rééducation orthophonique, et éventuellement une prise en charge psychologique.

Le diagnostic prénatal est fortuit et le conseil génétique rassurant.

IV 47,XYY

Il s'agit de garçons plutôt grands présentant un phénotype normal.

La prévalence est de l'ordre de 1 p 1000 naissance garçon. Cette prévalence est certainement sous diagnostiquée étant donné le phénotype normal associé à cette formule chromosomique. Il n'existe pas de dysgénésie gonadique ou d'infertilité, ni de criminalité incriminée par le passé.

Certains troubles du comportement ont été rapportés chez des individus présentant cette formule chromosomique, une prise en charge psychologique peut alors être indiquée.

Le diagnostic prénatal est fortuit et le conseil génétique rassurant.

V PRISE EN CHARGE DES DYSGONOSOMIES EN PRÉNATAL

L'annonce de la découverte prénatale de dysgonosomies est le plus souvent délicate lors du conseil génétique. Le diagnostic est le plus souvent fortuit et le couple ne s'attend pas à cette annonce. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une anomalie d'une particulière gravité et l'interruption médicale de grossesse est donc éthiquement discutable. L'attitude des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal peut être variable en fonction des cas. Les discussions avec les parents sont importantes.

Les dysgonosomies ne s'accompagnent pas de retard mental, mais des difficultés scolaires peuvent survenir, notamment en raison d'un retard de langage, qui pourra être pris en charge par orthophonie.

Il existe un biais de recrutement concernant les premières études sur les dysgonosomies rapportées dans la littérature médicale (basées majoritairement sur une population carcérale), faussant les corrélations génotype/phénotype. Il faut rappeler aux parents que la consultation des données concernant les dysgonosomies, notamment via internet, peut donner des informations erronées et les inquiéter exagérément. Il faut souligner que la plupart de ces dysgonosomies ne sont pas diagnostiquées étant donné leur faible retentissement sur le phénotype.

L'environnement familial joue un rôle primordial pour le développement de ces enfants qui peuvent bénéficier de soutien scolaire ou d'orthophonie s'ils présentent des difficultés. On observe notamment une différence dans le développement psychomoteur de ces sujets en faveur de ceux diagnostiqués avant la naissance plutôt que ceux diagnostiqués en postnatal. Les associations de parents sont également une aide utile à la prise en charge.

VI ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- Alves C, Braid Z, Coeli FB, Mello MP. : 46,XX male-Testicular disorder of sexual differentiation (DSD) : hormonal, molecular and cytogenetic studies. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010 Nov;54(8):685-9.
- Gruchy N, Vialard F, Decamp M, Choiset A, Rossi A, Le Meur N, Moiro H, Yardin C, Bonnet-Dupeyron MN, Lespinasse J, Herbaut-Graux M, Till M, Layet V, Leporrier N. : Pregnancy outcomes in 188 French cases of Klinefelter syndrome. Hum Reprod. 2011 Jul 5.
- HAS : Syndrome de Turner Protocole national de diagnostic et de soins janvier 2008
- Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. : Klinefelter's syndrome. Lancet 2004; 364:273-283.
- Linden MG, Bender BG, Robinson : A Genetic counselling for sex chromosome abnormalities. Am J Med Genet 2002; 110:3-10.
- Robinson A, Bender BG, Linden MG. : Prognosis of prenatally diagnosed children with sex chromosome aneuploidy. Am J Med Genet, 1992 ;44 :365-368.

Diagnostic prénatal des maladies génétiques

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

C. Coutton, V. Satre, F. Amblard et F. Devillard

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Le DPN chromosomique.....	3
I.1 Indications du caryotype fœtal.....	3
I.2 Types de prélèvements.....	4
I.3 FISH	5
II Le DPN moléculaire.....	5
II.1 ADN fœtal circulant.....	6
II.2 Autres techniques complémentaires	6
III Diagnostic préimplantatoire (DPI).....	6

Ce chapitre traitera du diagnostic prénatal (DPN) chromosomique et moléculaire. Il n'abordera pas les autres possibilités de DPN : échographiques, biochimiques,...

Le but du DPN est de diagnostiquer des affections à haut risque d'être gravement invalidantes et incurables (article L. 2131-1 du Code de Santé Publique) et éventuellement dans la cadre de la loi de permettre au couple de demander une interruption médicale de grossesse (Loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique).

Dans les situations de DPN, souvent difficiles, le rôle du médecin est d'accompagner le couple tout au long de la démarche. L'information, délivrée au cours d'une consultation de conseil génétique, doit être la plus complète possible. A l'issue de celle-ci la patiente signe un consentement pour la réalisation du DPN chromosomique ou moléculaire. Le médecin prescripteur signe une attestation de consultation de conseil génétique. Le résultat de l'analyse sera rendu à ce médecin prescripteur, qui devra le transmettre à la patiente. Dans tous les cas, une prise en charge psychologique doit pouvoir être proposée.

Le DPN est encadré par plusieurs textes législatifs qui sont accessibles sur le site de l'Agence de Biomédecine (<http://www.agence-biomedecine.fr>).

Pour plus de clarté, nous aborderons en deux chapitres différents le DPN chromosomique et le DPN génique (moléculaire).

I LE DPN CHROMOSOMIQUE

Il consiste en la réalisation d'un caryotype à partir d'un prélèvement foetal. Il peut être couplé à des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

Le caryotype permet une étude morphologique globale du matériel héréditaire (anomalies du nombre et de la structure des chromosomes). La FISH, grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes (fragments d'ADN marqués dirigés contre des régions spécifiques : centromères, télomères, locus spécifiques de syndrome, peinture chromosomique), permet une étude ciblée de certaines régions chromosomiques. Cette technique peut être appliquée sur des noyaux interphasiques ou des chromosomes en métaphases (après étape de culture).

I.1 INDICATIONS DU CARYOTYPE FŒTAL

Les anomalies chromosomiques surviennent le plus souvent accidentellement. Le DPN chromosomique est donc essentiellement réalisé chez des couples sans antécédents particuliers mais pour lesquels les moyens de dépistage (échographies, marqueurs sériques maternels) ont défini un risque particulier d'anomalies chromosomiques. En France, le dépistage concerne surtout la trisomie 21, principale aneuploïdie. En 2009, l'Agence de Biomédecine a enregistré la réalisation de 77 272 caryotypes. Ceci a permis l'identification de 3849 anomalies déséquilibrées et la réalisation de 2959 IMG.

Les indications reconnues et prises en charge par la sécurité sociale sont :

- Grossesse à risque de trisomie 21 foétale égal ou supérieur à 1/250. Celui-ci est évalué à partir de la combinaison entre l'âge maternel, les marqueurs sériques maternels du premier ou deuxième trimestre et l'épaisseur de la nuque mesurée au premier trimestre.
- Depuis l'arrêté du 23 juin 2009, l'âge maternel seul supérieur ou égal à 38 ans n'est plus une indication systématique. Il reste une indication exceptionnelle dans les situations où la patiente n'a pas pu bénéficier des autres moyens de dépistage.
- Signes d'appel échographiques. Le décret n°97-578 du 28 mai 1997 définit la mission et la composition des équipes des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN). Tout signe d'appel échographique doit être discuté au sein d'un CPDPN afin de définir s'il justifie la réalisation d'un caryotype.
- Antécédent pour le couple, de grossesse(s) avec caryotype anormal. Lorsque le caryotype des deux parents est normal, le risque de récurrence est de l'ordre de celui de la population générale. La réalisation du caryotype permet néanmoins de rassurer ce couple ayant déjà vécu une situation difficile.

- Les anomalies chromosomiques parentales. La présence chez un des parents d'un remaniement chromosomique justifiera dans tous les cas qu'un DPN soit proposé. Les modalités de celui-ci seront discutées avec la patiente en fonction des risques liés au remaniement et au prélèvement.
- Diagnostic de sexe pour les maladies liées à l'X. Malgré la persistance de cette indication, la réalisation d'un caryotype foetal devient de moins en moins fréquente car supplantée par la recherche d'ADN foetal dans le sang maternel. Cette technique de biologie moléculaire recherche la présence de séquences du gène SRY dans le sang maternel. Leur présence est le reflet d'un sexe foetal masculin et entraîne la réalisation d'un DPN invasif génique. Leur absence témoigne d'un sexe féminin et les investigations génétiques ne sont pas poursuivies.

Pour chaque indication le type de prélèvement dépend du risque chromosomique, du terme de la grossesse et du risque lié au prélèvement.

I.2 TYPES DE PRÉLÈVEMENTS

- **Prélèvement de trophoblaste ou de villosités choriales ou trophocentèse**

Le prélèvement de trophoblaste est réalisé le plus souvent entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée (SA), ce qui permet d'avoir un résultat précoce au cours de la grossesse. Il comporte un risque de fausses couches de 1 à 2 % (voie abdominale).

Un premier caryotype, dont le résultat est obtenu en 24 à 48 h, est réalisé à partir des mitoses spontanées du syncytiotrophoblaste. Il est complété par la réalisation d'un caryotype après culture des cellules de l'axe mésenchymateux. Le résultat final du caryotype est une synthèse de ces deux examens. Certains laboratoires réalisent à la place de l'examen direct une recherche des principales aneuploïdies (trisomies 13, 18 et 21) par FISH interphasique ou autre technique de quantification comme la QF-PCR.

Il existe de rares cas de discordance entre les résultats de l'examen direct et de la culture. Il est alors nécessaire de confirmer l'analyse chromosomique à partir d'un prélèvement de liquide amniotique.

- **Prélèvement de liquide amniotique ou amniocentèse**

Le prélèvement de liquide amniotique est le plus fréquemment employé. Il est réalisé à partir de 15 - 16 SA et est possible jusqu'au terme. Le risque de fausses couches est de 0,5 à 1 %.

La réalisation du caryotype nécessite une étape de culture cellulaire. Dans les situations à haut risque d'aneuploïdies (signes d'appel échographique), la FISH interphasique pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y permet un premier résultat rapide.

- **Prélèvement de sang fœtal ou cordocentèse**

Il est réalisé à partir de 22 SA, comporte un risque de fausse couche de 2 à 3 % ainsi qu'un risque important de morbidité. Pour ces raisons il est de moins en moins employé en dehors de situations exceptionnelles pour confirmer une anomalie rare découverte sur le liquide amniotique ou en cas de situation à très haut risque découverte tardivement.

I.3 FISH

Dans le cadre du diagnostic prénatal, elle est utilisée pour le diagnostic des aneuploïdies, des syndromes microdélétionnels (par exemple : cardiopathie cono-troncale et délétion 22q11.2) ou pour la caractérisation d'anomalies de structure des chromosomes.

La FISH interphasique permet essentiellement d'identifier les principales aneuploïdies (trisomies 13, 18 et 21) sur noyaux interphasiques en s'affranchissant de l'étape de culture cellulaire.

La FISH métaphasique identifie sur des chromosomes en métaphase, les principaux syndromes microdélétionnels et caractérise des anomalies de structure (marqueurs, translocations, chromosomes dérivés,...).

II LE DPN MOLÉCULAIRE

Le but du DPN moléculaire est l'identification des anomalies géniques par des techniques de biologie moléculaire. Le plus souvent il consiste à rechercher chez le fœtus la présence d'une ou de deux mutations préalablement identifiées, chez les parents ou un autre cas index. Le diagnostic est alors direct. De façon plus rare, on réalisera un diagnostic indirect à partir d'une étude familiale de ségrégation si la mutation n'est pas identifiée mais la localisation génique connue.

En l'absence d'antécédent familial, les situations où les signes échographiques orienteront vers un DPN moléculaire sont rares. En 2009, l'Agence de Biomédecine a enregistré la réalisation de 2728 tests de génétique moléculaire pour 213 pathologies différentes. Ceci a permis l'identification de 534 cas de fœtus atteints de maladie génétique et la réalisation de 385 IMG.

Les modes de prélèvements fœtaux sont les mêmes que pour le DPN chromosomique. Le choix du type de prélèvement dépend du risque génétique, du terme de la grossesse et du risque lié au prélèvement. Cependant le risque d'atteinte fœtale étant le plus souvent de 25 ou 50 %, le prélèvement de villosités choriales est privilégié en raison de sa précocité. De plus, ce tissu permet généralement l'extraction directe d'une quantité suffisante d'ADN pour la recherche de la ou des mutations voire pour une étude familiale indirecte.

Les études de biologie moléculaire peuvent également être réalisées à partir de l'ADN extrait des cellules amniotiques (analyse directe ou après culture) ou des cellules sanguines fœtales. Dans tous les cas, il est indispensable d'éliminer une contamination du prélèvement fœtal par de l'ADN maternel.

II.1 ADN FŒTAL CIRCULANT

Une étude de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel peut être proposée dans de rares situations comme le diagnostic de sexe dans les maladies liées à l'X et l'hyperplasie congénitale des surrénales. Cette technique permet également la caractérisation du Rhésus sanguin fœtal.

Elle permet de mieux cibler les indications du DPN invasif et/ou de proposer une prise en charge adaptée au cours de la grossesse (hyperplasie congénitale des surrénales et incompatibilité Rhésus).

II.2 AUTRES TECHNIQUES COMPLÉMENTAIRES

Il s'agit de techniques d'études quantitatives du génome qui permettent l'identification de pertes ou de gains de matériel héréditaire soit de façon ciblée (techniques de PCR quantitative) soit pangénomique (analyse chromosomique sur puce à ADN). Les niveaux de résolution de ces techniques sont intermédiaires entre le caryotype et les techniques classiques de biologie moléculaire.

Elles ne sont mises en œuvre actuellement que devant certains signes d'appel échographique ou pour l'identification d'anomalies de structures chromosomiques déséquilibrées. Comme pour toute technique réalisée à partir de l'extraction d'ADN, elles nécessitent la vérification de l'absence de contamination maternelle.

III DIAGNOSTIC PRÉIMPLANTATOIRE (DPI)

Le DPI est une alternative au DPN qui évite le recours à l'IMG et est proposé en France depuis 1999. Cette technique complexe nécessite la réalisation d'une fécondation in vitro avec ICSI (injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde). Au 3ème jour après fécondation, lorsque les embryons sont au stade de 8 cellules, une biopsie embryonnaire permet de prélever une à deux cellules afin de réaliser un diagnostic chromosomique (FISH) ou moléculaire. La difficulté réside dans la très faible quantité de matériel génétique et le risque de contamination par de l'ADN exogène (maternel ou autre) pour le versant moléculaire. Seuls des embryons sains sont transférés dans l'utérus maternel.

Les indications du DPI recouvrent celles du DPN et doivent être discutées au sein d'un CPDPN.

Néanmoins les contraintes supplémentaires liées à la technique doivent être prises en compte. D'une part, il est nécessaire que la femme dispose d'une réserve ovarienne suffisante et d'une bonne qualité ovocytaire. D'autre part, le nombre de pathologies pour lesquelles un DPI est réellement disponible est limitée (liste consultable sur le site de l'Agence de Biomédecine).

Actuellement cette technique est réalisée uniquement dans quelques centres français et les délais de prise en charge sont longs. En 2009, 276 couples ont bénéficié d'un DPI : 142 en génétique moléculaire (30 naissances) et 134 en cytogénétique (25 naissances). Globalement cette technique permet d'obtenir par ponction ovocytaire, un taux d'accouchement de 16 à 20 %.

Anomalies Chromosomiques dans les tumeurs solides

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Alain Bernheim

Laboratoire de Cytogénétique, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Des méthodes d'analyse des chromosomes en évolution (Tableau 1).....	3
II Matériel à analyser.....	5
III Les types d'altérations chromosomiques observées dans les tumeurs solides.....	5
IV Les altérations chromosomiques spécifiques de tumeurs (tableaux 3 & 4).....	9
V Pronostic et thérapeutique.....	9

Les cancers humains, maladies génomiques de la cellule, sont dus à des mutations génétiques, incluant les anomalies chromosomiques, généralement acquises, car observées uniquement dans les cellules tumorales et non dans les tissus normaux. Ces proliférations tumorales sont en règle clonales. Une cellule, promue par une anomalie initiale donnera naissance à des cellules filles formant ainsi le clone tumoral, chacune d'entre elles pouvant acquérir de nouvelles fonctionnalités via l'acquisition d'anomalies additionnelles de son génome. Compte tenu du nombre de cellules exposées, ce mécanisme récurrent agit de façon massivement parallèle. Cette sélection darwinienne pervertie au niveau cellulaire touche les caractères les plus favorables à la prolifération : vitesse de croissance, adaptation à un nouvel environnement, résistance aux traitements, caractère mutateur, etc. On conçoit que, dans ces conditions, les anomalies chromosomiques soient considérées comme non aléatoires : elles sont liées intimement au processus tumoral et sont le résultat de la sélection. Ces remaniements successifs codent pour les étapes, souvent (très) nombreuses, de la promotion, de la transformation et de la progression tumorale incluant les métastases.

I DES MÉTHODES D'ANALYSE DES CHROMOSOMES EN ÉVOLUTION (TABLEAU 1)

Les 46 chromosomes du génome humain, provenant pour moitié de chacun des parents, sont classiquement représentés avec deux chromatides nettement visibles, réunies par le centromère et terminées par les télomères, aspect qu'ils prennent lors de la métaphase, étape fugace de la mitose. En fait, les chromosomes sont relativement décondensés en interphase et ils occupent un «territoire» chromosomique avec des possibles protrusions d'ADN, portant des gènes souvent actifs, à distance. Depuis le séquençage du génome humain, la cartographie quasiment complète des gènes sur les chromosomes est disponible sur de nombreux sites internet publics. Ceci modifie profondément l'approche cytogénétique d'une tumeur.

Caryotype tumoral

Le caryotype classique se fait sur des cellules en division, ce qui oblige à obtenir des prélèvements vivants et stériles, sans certitude de succès de la mise en culture. Cette difficulté a réduit l'intérêt du caryotype en clinique au profit d'autres techniques non dépendantes de la survie des cellules (**tableau 1**).

La Fluorescence In Situ par Hybridation (FISH)

La FISH, (cf cytogénétique moléculaire), est utilisée en routine clinique avec des sondes commerciales. Elle détecte seulement les remaniements chromosomiques correspondant aux sondes utilisées. Elle fonctionne aussi bien sur des noyaux cellulaires (en interphase) que sur des chromosomes en mitose, permettant de s'affranchir des cultures cellulaires. Les empreintes cellulaires comme l'analyse des tissus fixés au formol et inclus en paraffine permettent désormais l'analyse par FISH de matériel tumoral, comme, par exemple, les

détections d'amplification géniques d'ERBB2/HER-2.

Micromatrices d'ADN (array CGH)

L'array CGH (aCGH) et autres techniques similaires (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), regroupées sous le terme d'Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA), quantifient l'ADN tumoral le long du génome humain de référence, sous réserve que les cellules malignes soient majoritaires. Les micromatrices pangénomiques, comprennent de 100 000 à 2 000 000 oligonucléotides, ce qui autorise un échantillonnage analytique de tout le génome tumoral à forte résolution. Les anomalies du nombre de copies de quelques dizaines de kb à un chromosome entier sont détectables sur tout le génome sans hypothèse a priori. Ces méthodes ne peuvent cependant pas détecter les translocations équilibrées (sans perte ni gain de matériel chromosomique) et leurs équivalents. L'hétérogénéité des clones tumoraux rend parfois l'interprétation de l'ACPA complexe et peut imposer des vérifications complémentaires, notamment par FISH ciblée.

Séquence

La séquence du génome complet commence à être envisagée pour des applications de recherche. Elle présentera l'avantage de détecter les remaniements équilibrés et non équilibrés.

Tableau 1 : Techniques utilisables en fonction du matériel biopsique fourni au laboratoire

Matériel étudié :	FISH	aCGH	Caryotype	Séquence complète
Tissus frais stériles*	+	+	+	+
Apposition**	+	-	-	-
Tissus congelés	+	+	-	+
Tissus fixés en paraffine***	+	+/-	-	-

*Recueil en milieu de culture.

** Cellules complètes étalées sur la lame : les noyaux sont entiers.

***Les noyaux sont tronqués. L'aCGH et la séquence complète à partir de ce matériel sont du domaine de la recherche

II MATÉRIEL À ANALYSER

Un prélèvement adéquat en qualité et en quantité est une nécessité dans des pathologies tumorales qui engagent le pronostic vital. Il est conditionné en fonction des méthodes d'analyse souhaitées (**tableau 1**). Un prélèvement tumoral congelé est très recommandé en oncologie et systématique chez l'enfant.

III LES TYPES D'ALTÉRATIONS CHROMOSOMIQUES OBSERVÉES DANS LES TUMEURS SOLIDES

Toutes les anomalies de nombre et de structure sont observables, individuellement et en combinaison, de la presque haploïdie (26-28 chromosomes) à l'hyperploïdie majeure (plus de 300 chr.) avec de multiples réarrangements structuraux. Certaines anomalies sont propres aux cellules tumorales : translocations spécifiques, et structures porteuses d'amplifications géniques, mais aussi des anomalies complexes. De plus, il existe souvent une certaine hétérogénéité des profils chromosomiques entre cellules d'une même tumeur (évolution clonale). Certaines anomalies -définies dans un autre chapitre- sont particulièrement observées dans toutes les proliférations malignes (**tableau 2**) : on distingue les translocations avec fusion de gènes entraînant un gène chimérique de celles qui dérèglent un gène par effet de position ; les gains de tout ou partie de chromosome avec le cas particulier de l'amplification génique ; les pertes de tout ou partie de chromosome. Des translocations sont de plus en plus souvent observées dans les cancers solides. (**tableaux 3 & 4**). Certains des gènes impliqués peuvent s'associer à de nombreux partenaires, comme *ALK* dans différentes proliférations, conduisant à un réseau entre les différents oncogènes.

Tableau 2 : Types d'Anomalies Chromosomiques en Oncologie

	Types d'anomalies	Gènes impliqués	Effet fonctionnel	Exemples
Type I	Gènes de fusion par translocation ou équivalent	Oncogènes, kinases....	Gain de fonction	FLI1-EWS dans les t(11;22), TMPRSS2-ERG dans les del(21)(q22.2)...
Type II	Effet de position par translocation ou équivalent	Oncogènes, facteurs de transcription ...	Dérégulation	MYC dans les t(8;14)(q24;q32)...
Type III	Gain de tout ou partie de chromosome	Oncogènes, autres gènes...	Dosage génique; (± gain de fonction)	Gain de MYC dans cancer du poumon, de MET dans la trisomie 7...

Type IIIa	Amplification de gène(s) sous forme de dm* ou de hsr**	Oncogènes, autres gènes...	Surexpression de gène(s); (± gain de fonction)	MYCN dans le neuroblastome, HER2 (ERBB2/NEU) dans le cancer du sein...
Type IV	Délétion, perte chromosomique, isodisomie totale ou partielle, inactivation par mutation génique.	Gènes suppresseurs de tumeur	Perte de fonction, hémi et homozygotie	Délétion du 13, Inactivation de Rb dans le rétinoblastome, Perte de 17p et de p53 dans divers cancers

* dm = chromosomes minuscules doubles, micro anneaux acentriques qui peuvent être très nombreux dans le noyau

** hsr = homogenous staining region, région de nombreuses répétitions (amplification) d'une séquence dans un chromosome

Tableau 3 : Exemples Sélectionnés de Rearrangements Chromosomiques dans les Tumeurs Solides de l'adulte

Tumeurs1	Altération Chromosomique2	Gène(s) impliqué(s)2	Type	Thérapie ciblée
Cérébrale, oligodendrogliome	del(1p) et/ ou del(19q)	?	IV	
Glioblastome, AC	amp(1)(q32)	MDM4	IIIa	
Colon	del(5)(q21-q22)	APC	IV	
Foie, carcinome hépatocellulaire	amp(11)(q13-q22)	BIRC2	IIIa	
Mélanome	amp(3)(p14.2-p14.1)	MITF	IIIa	
Poumon	amp(1)(p34.2)	MYCL1	IIIa	
id, AC	del(9)(p21)	CDKN2A/CDKN2B	IV	
Poumon (non à petite cellules)	inv(2)(p22-p21p23)	EML4-ALK	I	4

id, AC	amp(7)(p12)	EGFR	IIIa	5, 6
id, AC	amp(14)(q13)	NKX2-1	IIIa	
Prostate	del(21)(q22.3q22.2), var	TMPRSS2-ERG, var	I & II	
Rein, c. à cellules claires, AC	del(3)(p12p25)	VHL	IV	
Rein, cancer papillaire, AC	+7q31	MET	III	
id, AC	+17q	?	III	
Sein, AC	amp(6)(q25.1)	ESR1	IIIa	7
id, AC	amp(17)(q21.1)	ERBB2 (HER2)	IIIa	8
id, AC	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	I	
Testicule	+12p	?	III	
Thyroïde, cancer folliculaire	t(2;3)(q12-q14;p25)	PAX8-PPARG	I	
Thyroïde, cancer papillaire	inv(10)(q11.2q21)	RET-CCDC6 ou RET-NCOA4	I	
Tissus mous, liposarcome	t(12;16)(q13;p11)	CHOP-FUS	I	
Autres cancers	del(3p)	?	IV	
id	amp(8)(p11.2)	FGFR1	IIIa	
id	del(10)(q23.3)	PTEN	IV	
id	amp(11)(q13)	CCND1	II, IIIa	
id	del(11)(q22-q23)	ATM	IV	
id	amp(12)(p12.1), mutations	KRAS	IIIa	
id	amp(12)(q14.3)	MDM2	IIIa	

id	del(17)(p13.1)	TP53	IV	
id	del(17)(q11.2)	NF1	IV	

(pour détails voir <http://atlasgeneticsoncology.org>)

1 : Par organe, AC = autre(s) cancer(s)

2 : var = variants de réarrangements chromosomique ou/et génique

3 : Thérapeutiques ciblées contre des gènes impliqués dans des réarrangements chromosomiques

4 : Crizotinib. 5 : Cetuximab ou Panitumumab sauf quand KRAS est muté. 6 : Gefitinib, Erlotinib

7 : Tamoxifen. 8 : Trastuzumab, Lapatinib

Tableau 4 : Exemples Sélectionnés de Réarrangements Chromosomiques dans les Tumeurs

Tumeurs ¹	Altération Chromosomique ²	Gène(s) impliqué(s) ²	Type
Medulloblastome	amp(2)(p24.1)	MYCN	IIIa
<i>id</i> , AC	amp(8)(q24.2)	MYC	IIIa
<i>id</i> , AC	del(9)(p21)	CDKN2A/CDKN2B	IV
Néphroblastome (tumeur de Wilms)	del(11p)	WT1	IV
Neuroblastome	del(1p), +17q	?	IV
<i>id</i>	amp(2)(p24.1)	MYCN	IIIa
<i>id</i>	amp(2)(p23.1)	ALK	IIIa
Retinoblastome	del(13)(q14.2)	RB1	IV
Foie, tumeur desmoplastique	t(11;22)(p13;q12)	WT1-EWS	I
Rein, cancer papillaire	t(X;1)(p11;p34)	PSF-TFE3	I
Dermatofibrosarcome	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	I
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	I

<i>id</i>	t(2;13)(q37;q14)	PAX3-FKHR	I
Synovialosarcome	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SYT-SSX1/SSX2-SYT	I
Sarcome d'Ewing	t(11;22)(q24;q12.2)	FLI1-EWSR1	I
<i>id</i>	t(21;22)(q22.3;q12.2)	ERG-EWSR1	I

Solides de l'enfant et l'adolescent (pour détails voir <http://atlasgeneticsoncology.org>).

1 : Par organe, AC = autre(s) cancer(s)

2 : var = variants de réarrangements chromosomique ou/et génique

Faire références des tableaux dans le texte

IV LES ALTÉRATIONS CHROMOSOMIQUES SPÉCIFIQUES DE TUMEURS (TABLEAUX 3 & 4)

Certaines anomalies chromosomiques sont associées spécifiquement à un type de tumeur : ainsi dans les rhabdomyosarcomes de l'enfant une t(2;13)(q35;q14) ou sa variante t(1;13)(p36;q14) associe les gènes *PAX3* (chr2) ou *PAX7* chr1) à *FOXO1* (chr13) dans le seul rhabdomyosarcome alvéolaire.

V PRONOSTIC ET THÉRAPEUTIQUE

Dans d'autres cas les altérations du caryotype déterminent le pronostic comme dans le neuroblastome, autre tumeur pédiatrique, où la seule présence d'une anomalie chromosomique segmentaire signe un pronostic défavorable.

Enfin des anomalies chromosomiques peuvent coder pour des protéines, cibles de nouvelles thérapeutiques. Ainsi l'amplification d'ERBB2/HER-2 recherchée dans le cancer du sein d'abord, puis dans ceux de l'estomac, du poumon et d'autres tumeurs, est la cible du trastuzumab, anticorps monoclonal anti Her2 humanisé, qui améliore très significativement la survie. Dans d'autres cancers du poumon EGFR est la cible d'inhibiteurs de tyrosine kinase (Erlotinib, Gefetinib) ou d'anticorps monoclonaux (Panitumab). La translocation EML4-ALK vient de bénéficier du Crizotinib, première thérapeutique ciblée du cancer du poumon.

L'incidence de ces altérations spécifiques est très variable allant de près de 80% des cas pour les translocations impliquant TMPRSS2 dans le cancer de la prostate à moins de 1% dans des remaniements peu fréquents.

Des anomalies additionnelles souvent très nombreuses et complexes, s'y rajoutent.

Le suivi de la maladie résiduelle peut être réalisé par une FISH spécifique d'anomalies décelées au diagnostic

CONCLUSION

Au total les génomes des cancers se révèlent extrêmement variés et complexes, tout en offrant des cibles pour de nouvelles modalités thérapeutiques qui sont en plein développement.

Remerciements : Le professeur Monique Fabre a critiqué de manière très constructive ce document.

Bases moléculaires des mutations et Bases moléculaires du mode de transmission des maladies génétiques

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Martin Krahn

Département de Génétique Médicale - Hôpital Timone Enfants, AP-HM,
Et INSERM UMR910 - Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée
Marseille

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I Polymorphismes du génome	4
II Classification des lésions du génome.....	5
III Microlésions du génome.....	6
III.1 Généralités.....	6
III.2 Principaux types de microlésions et mécanismes de survenue.....	7
III.3 Conséquences des microlésions et impact sur les modes de transmission *.....	8
III.4 Conséquences des microlésions en fonction de leur localisation et de leur type.....	10
III.4.1 Conséquence des substitutions en séquence codante.....	11
III.4.2 Conséquence des insertions et/ou délétions de nucléotides en séquence codante... 	12
IV De la connaissance des types de microlésions à la conclusion de données mutationnelles : l'Interprétation de données mutationnelles.....	13

Note : Les notions importantes relatives aux modes de transmission des maladies génétiques sont indiquées par le symbole de l'étoile *.

INTRODUCTION

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. On parle aussi de « variants ».

Il est important de souligner d'emblée qu'on attribue souvent à tort une connotation pathologique à ce terme de « mutation ». Mais les variations non pathogènes de l'ADN (appelées « polymorphismes ») sont par définition également des mutations.

Les mutations sont le moteur de l'évolution, et source de la diversité entre individus. Mais elles sont aussi à l'origine des maladies génétiques monogéniques et des prédispositions génétiques aux maladies polyfactorielles. Le caractère pathogène d'une mutation pourra être précisé en parlant de « mutation délétère » ou « mutation pathogène ».

La conséquence de toute mutation dépend de son effet fonctionnel, qui peut être neutre, conduire à l'amélioration d'une fonction (diversité, évolution) ou à l'altération d'une fonction (effet pathogène).

Dans une cellule vivante, l'ADN est en permanence exposé à différents types d'agression pouvant conduire à l'apparition de mutations. Il s'agit essentiellement d'agressions « exogènes » (radiations et agents génotoxiques de l'environnement), d'agressions endogènes (radicaux libres, ...), d'erreurs de réplication et d'accidents de recombinaison.

La cellule possède une machinerie de réparation, qui corrige la plupart des anomalies. Mais un échappement au système de réparation est possible: c'est l'origine des mutations.

- *Mutations acquises :*

Une mutation apparue dans une cellule somatique d'un tissu est appelée « mutation somatique » ou « mutation acquise », puisqu'elle n'était pas présente initialement dans le génome de la cellule. Les mutations somatiques peuvent être à l'origine d'un clone cellulaire porteur de cette mutation, ne touchant qu'un seul ou quelques tissus, mais ne sont en revanche pas transmissibles à la descendance. Les mutations somatiques pathogènes sont notamment impliquées dans la formation de cellules tumorales.

- **Mutations constitutionnelles :**

Lorsqu'une mutation est présente ou survient avant la fécondation (soit nouvellement apparue, soit transmise de génération en génération), ou survient lors des premières divisions du zygote (donc nouvellement apparue), on parle de « mutation constitutionnelle ». Une mutation constitutionnelle sera présente dans toutes les cellules somatiques de l'individu, et également dans ses cellules germinales, donc transmissible à la descendance. Toute mutation nouvellement apparue est aussi appelée mutation « de novo » ou « néomutation ».

Certaines mutations surviennent lors de la méiose dans une cellule germinale, au niveau d'un gamète parental, et sont appelées « mutations germinales ». Les mutations germinales seront donc forcément présentes de façon « constitutionnelle » chez l'individu issu de ce gamète, qui sera donc porteur d'une mutation « de novo » ou « néomutation », non présente dans les cellules somatiques du parent qui lui a transmis cette mutation.

Les mutations constitutionnelles pathogènes, « de novo » ou transmises de génération en génération, sont à l'origine des maladies génétiques monogéniques et des maladies génétiques chromosomiques.

I POLYMORPHISMES DU GÉNOME

Comme cela a déjà été souligné précédemment, le terme de « 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.

Avant de s'intéresser aux effets délétères des variations du génome, il faut rappeler l'importance des variations non pathogènes du génome, qui sont la base de la diversité entre les individus.

Ces variations non pathogènes du génome sont appelées « polymorphismes ». La notion de « polymorphisme » repose à la fois sur le caractère non pathogène de la variation de séquence, et la fréquence dans la population (>1% par définition). Un polymorphisme est une mutation et peut se situer en région codante ou non codante.

Différents types de polymorphismes ont été caractérisés, parmi lesquels les plus importants à retenir dans le contexte actuel sont :

- **Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms):**

Il s'agit de polymorphismes de substitution au niveau d'un nucléotide (variation de séquence ponctuelle). Les SNPs sont très nombreux (>107 par génome humain) et répartis dans tout le génome (environ 1 SNP tous les 300 pb). Les SNPs sont référencés dans la base de données dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

- **Les CNVs (Copy Number Variations):**

Il s'agit de variation du nombre d'exemplaires contigus de grands segments génomiques (perte ou gain de fragments de quelques kb à plusieurs Mb). A ce jour, des CNVs ont été identifiés dans environ 15% du génome humain.

Les CNVs sont référencés dans la base de données Database for Genomic Variants : (<http://projects.tcag.ca/variation/>) ; avec plus de 65000 CNVs différents rapportés à ce jour).

- **Les polymorphismes de répétition:**

Il s'agit de séquences répétées en tandem de nombreuses fois, à partir de motifs de longueur variable (de quelques, à plusieurs centaines de paires de bases définissant en fonction de la taille les Microsatellites, Minisatellites, Satellites, et Mégasatellites).

II CLASSIFICATION DES LÉSIONS DU GÉNOME

On distingue les anomalies à l'échelle du chromosome appelées macrolésions et les anomalies à l'échelle du gène, appelées microlésions.

- *Macrolésions du génome*

Les anomalies chromosomiques sont classées en anomalies chromosomiques de nombre et anomalies chromosomiques de structure. Les anomalies de structure comportent différents types que nous n'allons pas détailler ici, par exemple les translocations, délétions, duplications de fragments chromosomiques, etc.

NB : les notions plus précises concernant les macrolésions du génome sont abordées plus en détail dans le chapitre intitulé « Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques » (D. Sanlaville).

- *Microlésions du génome*

A l'échelle du gène, les anomalies du génome sont surtout des substitutions appelées également mutations ponctuelles qui consistent en le remplacement d'un nucléotide par un autre. Il peut également s'agir de l'insertion et/ou de la délétion de quelques nucléotides et parfois jusqu'à quelques dizaines ou centaines de nucléotides.

- *Taille des lésions et méthodes d'étude*

A l'échelle du chromosome les anomalies sont recherchées par des approches qu'on appelle de génétique chromosomique (**cytogénétique**).

A l'échelle du gène, les anomalies sont recherchées par ce qu'on appelle les approches de **génétique moléculaire**.

Entre les deux, des techniques de **cytogénétique moléculaire** peuvent être utilisées. Il y a donc une différence de résolution des techniques ; en cytogénétique, il est possible de détecter des anomalies de quelques millions de paires de bases, alors qu'en génétique moléculaire, on recherchera des anomalies allant d'une seule paire de base à quelques milliers de paires de base. Il est à noter que le développement technologique actuel, et notamment les techniques d'analyses mutationnelles à haut débit, permettent de plus en plus d'élargir le champ de résolution.

III MICROLÉSIONS DU GÉNOME

III.1 GÉNÉRALITÉS

Les microlésions du génome constituent des anomalies à l'échelle du gène, en séquence codante ou non codante.

Il s'agit notamment :

- de substitutions, qui consistent en le remplacement d'un nucléotide par un autre
- d'insertions et/ou de délétions de 1 ou quelques nucléotides
- d'insertions et/ou délétions de quelques dizaines à centaines de nucléotides
- de mutations instables

NB : D'autres événements mutationnels plus rares existent, mais ne seront pas développés ici (inversions, mutagenèse induite par des éléments mobiles,...).

Un événement d'insertion consistant en la multiplication d'une séquence donnée est appelé « duplication » ($N=2$) ou « amplification » ($N>2$).

Le terme « mutation ponctuelle » est utilisé habituellement pour les microlésions touchant un ou quelques nucléotides (substitutions, insertions et/ou délétions de un ou quelques nucléotides).

Les microlésions peuvent être constitutionnelles (notamment dans le cadre des maladies

génétiques monogéniques) ou acquises (notamment impliquées dans la formation de cellules tumorales).

III.2 PRINCIPAUX TYPES DE MICROLÉSIONS ET MÉCANISMES DE SURVENUE

- *Substitutions*

Les substitutions constituent le remplacement d'un nucléotide par un autre nucléotide. Il s'agit du type le plus fréquent des microlésions, et globalement de loin le plus fréquent des remaniements affectant le génome, puisqu'elles représentent environ 70% des mutations. On distingue classiquement les transversions et les transitions.

Les *transitions* correspondent au remplacement d'une des purines (Adénine ou Guanine) par l'autre purine, ou d'une des pyrimidines (Cytosine ou Thymine) par l'autre pyrimidine.

Les *transversions* en revanche sont un changement d'une des pyrimidines en l'une des purines, ou le contraire, d'une des purines en l'une des pyrimidines.

Plusieurs mécanismes peuvent être en jeu dans la survenue des substitutions, et notamment des erreurs de réplication ayant échappé au système de réparation, des erreurs du système même de réparation, ou des perturbations biochimiques dues à des agents physiques ou chimiques exogènes ou produits par le métabolisme endogène.

- *Insertions et/ou de délétions de 1 ou quelques nucléotides*

Au cours du phénomène de réplication, des accidents de « dérapage réplicatif », impliquant les ADN polymérases, peuvent survenir, notamment au niveau de certaines séquences répétées. Ceci peut conduire à l'insertion (gain) et/ou à la délétion (perte) d'un ou de quelques nucléotides supplémentaires par rapport à la séquence initiale.

- *Insertions et/ou délétions de quelques dizaines à centaines de nucléotides*

Les microlésions de type insertion et/ou délétion de nucléotides peuvent concerner dans certains cas un grand nombre de nucléotides, de quelques dizaines à quelques centaines. Ces événements mutationnels peuvent impliquer des fragments, voire la totalité, d'un ou de plusieurs exons et/ou introns. Le mécanisme mutationnel est alors différent par rapport aux insertions et/ou délétions de un à quelques nucléotides, et fait suite à des réparations incomplètes de lésions de l'ADN, ou à des anomalies de recombinaison ou de réplication

- *Mutations instables*

Plusieurs notions importantes sont rattachées aux mutations instables : les notions d'**instabilité**, de **seuil**, de **prémuation** et **mutation complète**, et d'**anticipation**.

Certaines régions du génome présentent des répétitions de motifs de séquence d'ADN. Il peut s'agir de motifs dinucléotides (par exemple (TG)_n), trinucleotides (par exemple (CAG)_n), tétranucleotides, etc.

Ces répétitions peuvent être **instables**, c'est-à-dire avoir une tendance importante à la modification du nombre de répétitions du motif de base, au cours du phénomène de réplication. Cette modification est habituellement une expansion du nombre de répétitions, mais beaucoup plus rarement il peut également s'agir aussi d'une contraction. Elle survient surtout au cours de la réplication préméiotique (instabilité méiotique), donc lors de la transmission à la descendance. De plus, une instabilité mitotique peut exister. L'instabilité résulte d'un phénomène de dérapage répliatif (décrit ci-dessus), et peut concerner des régions codantes ou non codantes.

Le nombre de répétitions du motif de base est variable dans la population générale, mais se situe en dessous d'un **seuil**. En-dessous de ce seuil, la transmission de la répétition est stable de génération en génération. Par contre, au-delà de ce seuil, il y a instabilité et possibilité d'expansion du nombre de répétitions. Un nombre de répétitions modéré au-dessus du seuil constitue une « **prémutation** », avec une tendance à l'expansion, mais habituellement sans effet pathogène (phénotype habituellement normal, mais des exceptions existent selon les pathologies). Lorsque le nombre de répétitions dépasse une valeur limite au-dessus du seuil, entraînant l'apparition de la pathologie, on parle de « **mutation complète** ».

Les mutations instables sont impliquées notamment dans la survenue de certaines maladies neurodégénératives et neuromusculaires*.

On observe dans les maladies causées par des mutations instables un biais de transmission parentale des formes les plus sévères, et une augmentation au cours des générations successives du risque de développer la maladie, ou de la sévérité ou précocité des signes (phénomène « d'**anticipation** »).

III.3 CONSÉQUENCES DES MICROLÉSIONS ET IMPACT SUR LES MODES DE TRANSMISSION *

Les conséquences délétères des microlésions du génome dépendent essentiellement de leur **localisation** et de leur **type**.

Il est important de souligner que l'effet délétère d'une microlésion peut consister en un impact fonctionnel au niveau de l'ARN messenger et/ou de la protéine codée par le gène muté.

En effet, l'exemple le plus « classique » d'une microlésion est une anomalie de la séquence codante d'un gène, conduisant à une anomalie de la séquence en acides aminés de la protéine codée par ce gène, responsable d'une altération qualitative et/ou quantitative de la protéine. Mais les effets délétères possibles des microlésions sont multiples et complexes, dépassant largement la linéarité directe entre la séquence codante au niveau du gène et la séquence en acides aminés au niveau de la protéine.

Pour toute microlésion, il faut donc prendre en compte l'impact fonctionnel éventuel au niveau de l'ARN messager et/ou de la protéine codée. Il s'agit là d'une notion primordiale à retenir pour l'interprétation des données mutationnelles dans le cadre du diagnostic moléculaire.

Les conséquences délétères des microlésions sont classées en deux grandes catégories : la **perte de fonction** et le **gain de fonction**.

- ***Perte de fonction**** :

On désigne par **perte de fonction** un effet délétère du à la **diminution ou l'abolition de production de la protéine active, sur le plan quantitatif (niveau de synthèse de la protéine) et/ou qualitatif (fonctionnalité de la protéine)**. L'effet délétère de type perte de fonction se manifeste lorsque le niveau résiduel de protéine fonctionnelle passe en dessous d'un seuil, **et constitue la cause majoritaire des maladies récessives**. Lorsqu'une seule des deux copies d'un gène est mutée chez un individu, la synthèse d'une protéine normale par l'allèle non muté suffit habituellement pour maintenir la fonction cellulaire correspondante. Par contre, l'effet délétère se manifeste lorsque les deux copies du gène sont mutées.

Dans certains cas, la perte de fonction peut toutefois conduire à un effet délétère dominant. La présence d'une seule copie mutée du gène, à l'état hétérozygote, est alors suffisante pour franchir le seuil. Cette situation est appelée « **haploinsuffisance** », l'autre copie du gène n'étant pas suffisante pour compenser le déficit.

La perte de fonction peut résulter d'un effet délétère au niveau de l'ARN messager : par effet sur la régulation de la transcription, par altération de la maturation de l'ARNm (notamment l'épissage), par altération de la stabilité de l'ARNm entraînant sa destruction. Ceci va conduire à une diminution ou absence de production de la protéine active.

La perte de fonction peut également résulter d'un effet délétère au niveau de la protéine, qui peut être produite, mais instable et dégradée ; ou encore produite mais non fonctionnelle.

- ***Gain de fonction**** :

Le « gain de fonction » est un effet délétère du à l'acquisition d'une nouvelle fonction qui est délétère pour la cellule. Il s'agit de la cause majoritaire des maladies dominantes.

Le gain de fonction résulte habituellement d'un effet délétère au niveau de la protéine. Il peut s'agir tout d'abord d'un effet appelé « **dominant négatif** » : le produit protéique de l'allèle muté antagonise le produit de l'allèle normal (en particulier lorsque le produit du gène agit sous la forme de dimère ou polymère). Une autre possibilité est un effet « **toxique** », lorsque la mutation conduit à l'acquisition d'une nouvelle fonction cellulaire délétère, ou suite à un excès de fonctionnement.

L'effet délétère peut aussi se situer au niveau de l'ARN messenger, entraînant par exemple la séquestration d'ARNm mutés, ou la séquestration de protéines par des ARNm mutés. Mais les mécanismes exacts du gain de fonction délétère au niveau de l'ARNm restent encore mal élucidés à ce jour.

III.4 CONSÉQUENCES DES MICROLÉSIONS EN FONCTION DE LEUR LOCALISATION ET DE LEUR TYPE

La majorité des microlésions délétères est localisée en séquence codante, avec un effet direct sur la séquence en acides-aminés de la protéine correspondante. Plus rarement, des microlésions en région codante ou non-codante peuvent avoir un effet délétère sur la régulation de l'expression d'une protéine.

L'information génétique pour la synthèse des protéines est contenue majoritairement dans les exons. L'enchaînement en nucléotides de la séquence codante détermine, grâce au code génétique, l'enchaînement en acides-aminés de la protéine qui sera synthétisée. L'effet délétère des microlésions en séquence codante dépend alors essentiellement du *type* de microlésion (détaillé dans le paragraphe suivant). Mais le processus de synthèse protéique dépasse la simple linéarité entre la séquence codante génomique et la séquence en acides-aminés de la protéine correspondante, et fait intervenir des mécanismes complexes de régulation de l'expression. Les phénomènes d'organisation dynamique des loci génomiques, de transcription, d'expression et de maturation protéique sont ainsi contrôlés par des séquences régulatrices, qui peuvent être localisées hors de la séquence codante (introns, exons non-codants, régions intergéniques, ...), voire même directement dans la séquence codante. Toute microlésion altérant l'un de ces phénomènes peut avoir un effet délétère.

- *Microlésions en séquence codante*

NB : Par la linéarité du code génétique, une mutation en séquence codante génomique peut avoir un effet directement transposé au niveau de la séquence en acides-aminés de la protéine codée. Mais comme souligné auparavant, il ne faut pas oublier que toute mutation en séquence codante peut avoir un éventuel effet délétère sur l'ARN messager. **Pour toute microlésion, il faut donc prendre en compte l'impact fonctionnel éventuel au niveau de l'ARN messager et/ou de la protéine codée.**

III.4.1 Conséquence des substitutions en séquence codante

- Mutation de type « faux-sens »: le codon muté code un autre acide aminé*

La modification d'acide-aminé au niveau de la protéine peut être tolérée par la cellule sans conséquence délétère, ce qui explique que de nombreuses variations de séquence de type « faux-sens » n'ont pas d'effet pathogène, et constituent par ailleurs une part importante des polymorphismes (de type SNPs). Mais en fonction de la localisation de l'acide-aminé touché, les mutations faux-sens peuvent avoir des effets délétères (altération du repliement protéique, de la stabilité protéique, de domaines fonctionnels, de sites d'interaction avec d'autres protéines, etc.), de type perte de fonction ou gain de fonction.

- Mutation de type « non-sens »: le codon muté code un codon stop*

Ce type de mutation est généralement pathogène, responsable de la synthèse d'une protéine tronquée, qui sera instable et dégradée (effet perte de fonction), ou avec un effet dominant négatif (effet gain de fonction).

- Le cas particulier des mutations de type « isosémantique » ou « synonyme »: le codon muté code pour le même acide aminé

Le code génétique étant « dégénéré » (plusieurs codons pouvant coder un même acide-aminé), certaines substitutions au niveau de la séquence génomique ne modifient théoriquement pas la séquence en acides-aminés de la protéine correspondante, donc seraient sans effet pathogène. Ces mutations « isosémantiques » ont ainsi également été appelées « silencieuses ». Comme de nombreuses variations de type « faux-sens », les mutations « isosémantiques » constituent aussi une part importante des polymorphismes (de type SNPs). Cependant, depuis une dizaine d'années, il a été clairement démontré que certaines mutations « isosémantiques » peuvent avoir un effet délétère, résultant non d'une modification directe de la séquence protéique, mais d'un effet délétère de la mutation génomique sur un motif de séquence nucléotidique (par exemple effet sur un motif impliqué dans l'épissage, sur un motif impliqué dans la régulation du niveau d'expression,

etc.) Ce type de mutation est donc le meilleur exemple soulignant que pour toute microlésion, il faut prendre en compte l'impact fonctionnel non seulement au niveau de la protéine codée, mais aussi au niveau de l'ARN messager.

III.4.2 Conséquence des insertions et/ou délétions de nucléotides en séquence codante

La conséquence des insertions et/ou délétions de nucléotides dépend schématiquement de la conséquence sur le cadre de lecture, défini par la succession des codons constituant la séquence codante. Puisque chaque codon comporte trois nucléotides, deux situations sont possibles :

- **Les insertions et/ou délétions de multiples de trois nucléotides** , n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture. La conséquence au niveau protéique pourra être un gain ou une perte en acides-aminés, avec éventuellement un changement d'acide-aminé par rapport à la séquence initiale, au niveau de la jonction résultant de l'insertion et/ou la délétion. Le retentissement fonctionnel est variable selon la localisation au niveau de la protéine : l'insertion et/ou la délétion de nouveau(x) acide(s)-aminé(s) peut être « tolérée », ou délétère. Un effet délétère important peut aussi résulter de la création d'un codon stop à la jonction résultant de l'insertion et/ou la délétion.

- **Les insertions et/ou délétions de non-multiples de trois nucléotides**, responsables d'un décalage du cadre de lecture, qui entraînera la survenue prématurée d'un codon stop (ou dans de rares cas un décalage du codon stop en aval). L'effet délétère sera donc semblable à l'effet des mutations non-sens: synthèse d'une protéine tronquée, qui sera instable et dégradée (effet perte de fonction), ou avec un effet dominant négatif (effet gain de fonction)*.

Il y a donc un retentissement fonctionnel sévère expliquant que ce type de mutation est généralement pathogène.

- ***Microlésions en séquence non-codante***

Les microlésions en séquence non-codante peuvent également être de type substitution ou délétions/insertions, de la même manière que les microlésions en séquence codante. Les séquences non-codantes (comportant notamment les introns et les régions intergéniques) constituent plus de 95% du génome, et ont longtemps été considérées comme non-fonctionnelles (« junk DNA » ou « ADN poubelle »). Mais il est aujourd'hui clairement établi que l'ADN non-codant comporte des séquences régulatrices essentielles pour l'expression des gènes.

En conséquence, des mutations en séquence non-codante peuvent avoir des effets délétères en altérant des séquences régulatrices. Il peut s'agir par exemple d'effets délétères sur la

régulation de la transcription (mutations du promoteur, d'Enhancers, de Silencers,...), de la maturation de l'ARN messager (et surtout l'épissage) ou de la stabilité de l'ARN messager. Encore une fois, l'effet délétère peut se situer au niveau de l'ARN messager (effet direct quantitatif ou qualitatif) ou au niveau protéique (effet indirect quantitatif ou qualitatif).

Il est à souligner que les techniques routinières de génétique moléculaire, et en particulier le séquençage direct (méthode de Sanger), imposent des limites en termes de taille de séquence analysable. Ceci constitue la principale raison pour laquelle **une analyse mutationnelle d'un gène porte le plus souvent essentiellement sur les exons du gène (analyse de la séquence codante), et les bornes introniques flanquantes (analyse des sites donneurs et accepteurs d'épissage). C'est en général dans ces régions que sont concentrées la majeure partie des mutations délétères.** Avec les techniques routinières, il serait trop lourd, long et coûteux d'analyser pour un gène donné la totalité du locus génomique correspondant, dont la taille est au moins dix fois plus grande que la séquence codante. Ainsi, une grande partie des régions non-codantes d'un gène donné n'est donc pas analysée en routine, ne permettant pas de mettre en évidence d'éventuelles mutations délétères dans ces régions.

L'avènement des techniques d'analyse moléculaire à haut débit, en particulier le séquençage à haut débit, devrait permettre d'être plus exhaustif.

IV DE LA CONNAISSANCE DES TYPES DE MICROLÉSIONS À LA CONCLUSION DE DONNÉES MUTATIONNELLES : L'INTERPRÉTATION DE DONNÉES MUTATIONNELLES

Qu'il s'agisse d'application à visée de recherche ou diagnostique, l'objectif des analyses mutationnelles est d'identifier des variations de séquence, et de conclure sur leur caractère pathogène ou non.

- *Nomenclature des mutations*

L'identification de variations de séquence dans un échantillon, en comparaison à une séquence de référence, nécessite dans un premier temps une description précise de ces variations. La « Human Genome Variation Society » a établi une nomenclature officielle internationale pour la description des données mutationnelles (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). Cette nomenclature permet une description précise de variations de séquences d'un gène, sur le plan génomique, transcriptionnel (ARNm) et protéique.

De manière simplifiée, la règle consiste à décrire la localisation de la variation de séquence, par rapport à la séquence codante du gène, et le changement induit. Selon la technique de génétique moléculaire utilisée (analyse génomique ou transcriptionnelle), la description est faite par rapport à la séquence codante sur le plan génomique (indiqué par « c. ») ou sur le plan de l'ARN messager (indiqué par « r. »). En supplément, l'effet théorique attendu au niveau protéique est indiqué entre parenthèses, précédé de « p. ». La séquence de référence utilisée doit être indiquée.

Exemple : pour un patient porteur de deux mutations à l'état hétérozygote dans le gène de la dysferline (séquence de référence GenBank NM_003494.2) :

Exon 9 : c.895G>T (p.Gly299Trp) HTZ : il s'agit d'une substitution d'une guanine par une thymine dans l'exon 9 du gène de la dysferline, responsable théoriquement du remplacement d'un acide-aminé glycine par un acide-aminé tryptophane en position 299 de la séquence protéique, donc une mutation de type faux-sens.

Exon 18 : c.1617C>G (p.Tyr539*) HTZ : il s'agit d'une substitution d'une cytosine par une guanine dans l'exon 18 du gène de la dysferline, responsable théoriquement du remplacement d'un acide-aminé tyrosine par un codon STOP en position 539 de la séquence protéique, donc une mutation de type non-sens.

- **Interprétation de données mutationnelles**

La nomenclature constitue donc la première étape importante dans l'interprétation des données mutationnelles, en déterminant le type de mutation (faux-sens, non-sens, isosémantique, etc.). Comme cela a été détaillé plus haut, certains types de mutations ont un effet pathogène hautement probable (par exemple des mutations non-sens), alors que pour d'autres types la conclusion peut être plus difficile (par exemple des mutations faux-sens).

Après avoir précisément nommé la mutation, deux situations sont possibles : cette variation de séquence a déjà été décrite au préalable, ou non. Cette information sera obtenue par la consultation de bases de données mutationnelles. Un portail de la plupart des bases de données est disponible sur le site web de la « Human Genome Variation Society » (<http://www.hgvs.org>).

De nombreuses bases de données mutationnelles existent aujourd'hui, dont certaines collectent des données concernant la totalité du génome humain (*bases de données « centrales » ou « globales »*), et notamment des informations sur les polymorphismes alimentées par des projets de grande envergure de séquençage de génomes. Parmi les plus utilisées on trouve : UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) ; Ensembl (<http://www.ensembl.org>); SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>); Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org>).

D'autres bases de données sont dédiées spécifiquement à un gène donné : ces **bases de données appelées « locus-spécifiques »** sont mises à jour par des spécialistes travaillant sur le gène concerné, ce qui permet une mise à jour très précise. Il n'en existe malheureusement pas encore pour tous les gènes.

Dans la démarche d'interprétation de données mutationnelles, la consultation de bases de données permet donc de vérifier si une variation de séquence a déjà été rapportée au préalable.

Si la variation de séquence a déjà été rapportée, les informations disponibles peuvent permettre de savoir si elle a un caractère délétère qui a déjà été confirmé au préalable chez d'autres patients, ou au contraire si elle a été identifiée sans effets pathologiques dans la population générale (polymorphisme). Ceci permet souvent de conclure sur le caractère pathogène ou non.

La situation est plus difficile pour les variations de séquence non rapportées au préalable, et la conclusion sur le caractère délétère ou non doit alors prendre en compte différents éléments. Il s'agit notamment du type de mutation (non-sens, faux-sens, etc.), de l'étude de la ségrégation de la variation de séquence à l'intérieur de la famille, et de la recherche de la variation dans une population de témoins sains. Dans certains cas, il est nécessaire de recourir à des tests fonctionnels (évaluation de l'épissage, fonctionnalité de la protéine, etc.), mais ceci est difficile en routine diagnostique. Une progression importante a été possible grâce au développement d'**outils bioinformatiques, permettant la modélisation et la prédiction de l'effet fonctionnel de variations de séquences**. Certains algorithmes permettent par exemple de prédire l'effet d'une mutation sur l'épissage, ou encore d'évaluer l'effet fonctionnel du remplacement d'un acide-aminé par un autre. Ces outils bioinformatiques deviennent de plus en plus performants, et apportent dorénavant une aide importante voire incontournable dans l'interprétation des données mutationnelles.

L'évaluation de ce faisceau d'éléments constitue souvent la difficulté de l'interprétation des données mutationnelles, et ne permet malheureusement pas toujours d'aboutir à une conclusion formelle. Avec l'avènement des techniques d'analyse moléculaire à haut débit, et la génération de plus en plus facile d'importantes quantités de données mutationnelles, l'interprétation risque de devenir un goulot d'étranglement et le développement d'outils bioinformatiques performants et adaptés est essentiel.

NB : des notions plus détaillées concernant les « Bases de données et outils bioinformatiques utiles en Génétique » sont abordées dans le chapitre rédigé par C. Bérout.

Pour en savoir plus...

L'ouvrage de référence recommandé aux lecteurs pour approfondir les notions abordées, est le livre « Biologie moléculaire et Médecine » de Jean-Claude Kaplan et Marc Delpech (Médecine Science, Flammarion).

Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétiqúe

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

C. Bérout

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Concepts.....	3
I.1	La bioinformatique.....	3
I.2	Les bases de données.....	4
II	Les banques de données utiles dans le domaine de la génétique.....	6
II.1	Les "Genome Browsers".....	6
II.2	L'annotation : outils et bases de données.....	8
II.3	Structure des protéines.....	9
II.4	Les bases de données dédiées aux maladies génétiques.....	10
II.5	Variabilité du génome humain.....	11
II.5.1	Les bases de données centrales.....	11
II.5.1.1	Les bases de données centrales dédiées aux SNPs.....	11
II.5.1.2	Les bases de données centrales dédiées aux CNVs.....	12
II.5.1.3	Les bases de données centrales dédiées aux mutations pathogènes.....	12
II.5.2	Les bases de données spécifiques de locus.....	12
III	Outils informatiques utiles dans le domaine de la génétique.....	13
III.1	Prédiction des changements de stabilité des protéines.....	13
III.2	Prédiction de l'agrégation des protéines.....	13
III.3	Prédiction des régions désordonnées.....	14
III.4	Prédiction du caractère pathogène des mutations faux-sens.....	14
III.5	Prédiction du caractère pathogène des mutations introniques.....	14
IV	Exemples.....	15
IV.1	Interprétation d'une mutation synonyme.....	15
IV.2	Interprétation de mutations faux-sens.....	17

Avec le développement de la génétique et des nouvelles technologies à très haut débit, nous faisons actuellement face à la production de données à un niveau encore jamais atteint. En effet, il est aujourd'hui démontré que les données produites par les technologies de séquençage à haut débit seront plus importantes que tout ce qui a jamais été produit dans le passé y compris le web lui même ! Nous faisons donc face à de multiples challenges tant pour le stockage de ces données (les nouvelles plateformes de séquençage peuvent produire jusqu'à 0,1 téraoctets de données par heure) que pour leur analyse.

Heureusement, nous ne partons pas de zéro. La communauté scientifique a depuis longtemps compris que la bonne utilisation des données pouvait permettre d'accélérer les découvertes scientifiques et ceci a rapidement conduit à l'émergence d'une nouvelle discipline : la bioinformatique.

L'objectif de ce cours est donc de faire le point sur les apports de la bioinformatique notamment par les différentes bases de données et outils bioinformatiques qu'elle a permis de créer ces dernières années et qui sont aujourd'hui autant d'outils incontournables pour les généticiens.

I CONCEPTS

I.1 LA BIOINFORMATIQUE

Lors de sa création, la bioinformatique correspondait à l'utilisation de l'informatique pour stocker et analyser les données de la biologie moléculaire. Cette définition originale a maintenant été étendue et le terme bioinformatique est souvent associé à l'utilisation de l'informatique pour résoudre les problèmes scientifiques posés par la biologie dans son ensemble. Il s'agit dans tous les cas d'un champ de recherche multidisciplinaire qui associe informaticiens, mathématiciens, physiciens et biologistes.

Comme le décrit très bien **Jean-Michel Claverie** : *"La bioinformatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation de l'information génétique (séquences) et structurale (repliement 3-D). C'est le décryptage de la "bio-information" ("Computational Biology" en anglais). La bioinformatique est donc une branche théorique de la Biologie. Son but, comme tout volet théorique d'une discipline, est d'effectuer la synthèse des données disponibles (à l'aide de modèles et de théories), d'énoncer des hypothèses généralisatrices (ex. : comment les protéines se replient ou comment les espèces évoluent), et de formuler des prédictions (ex. : localiser ou prédire la fonction d'un gène)".*

Pour aboutir à la formulation de ces modèles et à ces prédictions, il est indispensable de tout d'abord collecter et organiser les données à travers la création de bases de données.

I.2 LES BASES DE DONNÉES

Une base de données est un ensemble structuré et organisé permettant le stockage de grandes quantités d'informations afin d'en faciliter leur utilisation (ajout, mise à jour, recherche et éventuellement analyse dans les systèmes les plus évolués que nous verrons par la suite).

Elles sont toutes organisées en fonction d'un modèle de données (*data model*) qui peut être de différents types : modèle hiérarchique (*hierarchical model*), modèle en réseau (*network model*), modèle relationnel (*relational model*), modèle orienté objet (*object-oriented model*), modèle semi structuré (*semistructured model*), modèle associatif (*associative model*), modèle EAV (*Entity-Attribute-Value data model*) ou encore modèle contextuel (*context model*). [Pour en savoir plus : *database models*].

L'un des modèles les plus utilisés aujourd'hui est le modèle de bases de données relationnelles qui a été inventé en 1970 par **Edgar Frank Codd**.

Ce modèle repose ainsi sur les 12 règles de Codd (*source Wikipédia*):

Règle 1 : **Unicité** : Toute l'information dans la base de données est représentée d'une et une seule manière, à savoir par des valeurs dans des champs de colonnes de tables.

Règle 2 : **Garantie d'accès** : Toutes les données doivent être accessibles sans ambiguïté. Cette règle est essentiellement un ajustement de la condition fondamentale pour des clés primaires. Elle indique que chaque valeur scalaire individuelle dans la base de données doit être logiquement accessible en indiquant le nom de la table contenant, le nom de la colonne contenant et la valeur principale primaire de la rangée contenant.

Règle 3 : **Traitement des valeurs nulles** : Le système de gestion de bases de données doit permettre à chaque champ de demeurer nul (ou vide). Spécifiquement, il doit soutenir une représentation "d'information manquante et d'information inapplicable" qui est systématique, distincte de toutes les valeurs régulières (par exemple, "distincte de zéro ou tous autres nombres," dans le cas des valeurs numériques), et ce indépendamment du type de données. Cela implique également que de telles représentations doivent être gérées par le système de gestion de bases de données d'une manière systématique.

Règle 4 : **Catalogue lui-même relationnel** : Le système doit supporter un catalogue en ligne, intégré, relationnel, accessible aux utilisateurs autorisés au moyen de leur langage

d'interrogation régulier. Les utilisateurs doivent donc pouvoir accéder à la structure de la base de données (catalogue) employant le même langage d'interrogation qu'ils emploient pour accéder aux données de la base de données.

Règle 5 : Sous-langage de données : Le système doit soutenir au moins un langage relationnel qui : a une syntaxe linéaire ; peut être employé interactivement et dans des programmes d'application ; supporte des opérations de définition d'informations supplémentaires (incluant des définitions de vues), de manipulation de données (mise à jour aussi bien que la récupération), de contraintes de sécurité et d'intégrité, et des opérations de gestion de transaction (commencer, valider et annuler une transaction).

Règle 6 : Mise à jour des vues : Toutes les vues pouvant théoriquement être mises à jour doivent pouvoir l'être par le système.

Règle 7 : Insertion, mise à jour, et effacement de haut niveau : Le système doit supporter les opération par lot d'insertion, de mise à jour et de suppression. Ceci signifie que des données peuvent être extraites d'une base de données relationnelle dans des ensembles constitués par des données issues de plusieurs tuples et/ou de multiples table. Cette règle explique que l'insertion, la mise à jour, et les opérations d'effacement devraient être supportées aussi bien pour des lots de tuples issues de plusieurs tables que juste pour un tuple unique issu d'une table unique.

Règle 8 : Indépendance physique : Les modifications au niveau physique (comment les données sont stockées, si dans les rangées ou les listes liées etc...) ne nécessitent pas un changement d'une application basée sur les structures.

Règle 9 : Indépendance logique : Les changements au niveau logique (tables, colonnes, rangées, etc) ne doivent pas exiger un changement dans l'application basée sur les structures. L'indépendance de données logiques est plus difficile à atteindre que l'indépendance de donnée physique.

Règle 10 : Indépendance d'intégrité : Des contraintes d'intégrité doivent être indiquées séparément des programmes d'application et être stockées dans le catalogue. Il doit être possible de changer de telles contraintes au fur et à mesure sans affecter inutilement les applications existantes.

Règle 11 : Indépendance de distribution : La distribution des parties de la base de données à de diverses localisations doit être invisible aux utilisateurs de la base de données. Les applications existantes doivent continuer à fonctionner avec succès : quand une version distribuée du système de gestion de bases de données est d'abord présentée ; et quand des données existantes sont redistribués dans le système.

Règle 12 : **Règle de non-subversion** : Si le système fournit une interface de bas niveau, cette interface ne doit pas permettre de contourner le système (par exemple une contrainte relationnelle de sécurité ou d'intégrité).

Afin de créer ces banques de données relationnelles, il est nécessaire d'avoir recours à un système informatique nommé Système de Gestion de Bases de Données Relationnel (SGBDR) dont les plus connus sont : *Oracle, Access, SQLServer, Informix, Sybase, DB2, MySQL, 4D, Filmaker...*

Ces SGBDR permettent alors d'accéder à la base de données directement via Internet afin d'en assurer la diffusion la plus large possible.

II LES BANQUES DE DONNÉES UTILES DANS LE DOMAINE DE LA GÉNÉTIQUE

II.1 LES "GENOME BROWSERS"

Ils correspondent à différentes bases de données qui permettent d'accéder aux données du génome humain (et de celui d'autres espèces) à l'aide d'une interface graphique. En plus des données de séquence, ces navigateurs permettent d'accéder à de nombreuses données d'annotation (gènes avec exons et introns, sites de fixation, régions d'homologie) (cf. 3.1 :)).

Les plus populaires sont :

- **Ensembl** (*European Bioinformatics Institute / Wellcome Trust Sanger Institute*)
- **NCBI** (*National Cancer for Biology Information*)
- **UCSC** (*University of California Santa Cruz*)

D'autres méritent également le détour :

- **Vista** (*University of California*)
- **Argo** (*BROAD Institute*)
- **Mochiview** (*University of California Santa Cruz*)
- **X:map** (*Paterson Institute for Cancer Research*)
- **DiProGB** (*Leibniz Institute for Age Research*)
- **Genatlas** (*Université René Descartes - Paris*)

Si l'ensemble des "Genome Browsers" permet d'accéder à de très nombreuses données, aucun d'entre eux ne génère ces données. Ils sont donc dépendants d'autres centres ou laboratoires de recherche qui eux les produisent. Ceci explique pourquoi les mêmes données sont partagées par ces différents navigateurs et c'est souvent l'interface qui oriente vers l'un plutôt que l'autre ou la richesse des outils d'analyse associés.

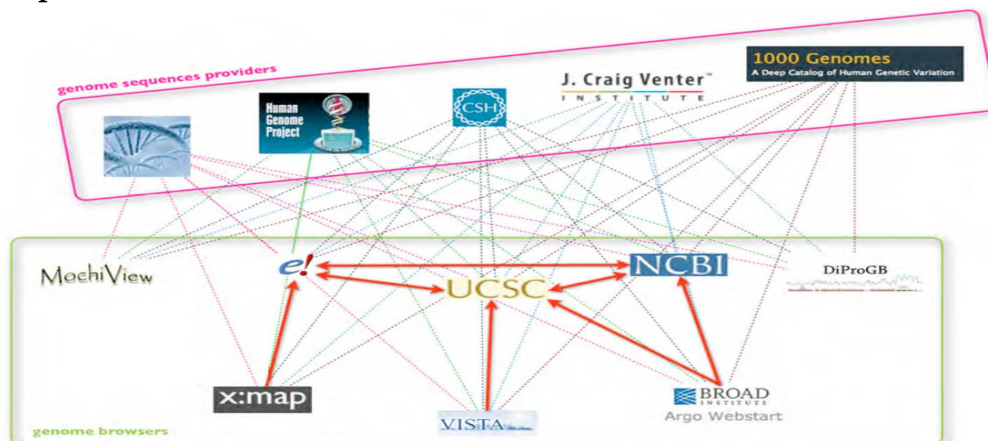
Il existe cependant des "Genome Browsers" dédiés à un projet de recherche particulier. Dans ce cas, leur champ d'action est plus réduit mais ils fournissent directement les données et sont donc responsables de leur qualité. Il est en effet critique de s'assurer de la qualité des données collectées dans une base de données car si elle est ouverte à tous, sa qualité ne pourra être assurée et les données qu'elle contient seront vite d'une utilité limitée comme nous le verrons dans le chapitre dédiée aux banques de données de mutations ((cf. 2.5.1 :)).

Trois bases de données illustrent bien cette catégorie :

- *James Watson's Personal Genome Sequence (Baylor College of Medicine)*
- *Craig Venter's Personal Genome Sequence (Craig Venter Institute)*
- *1000 genomes project (Projet international)*

Comme nous l'avons vu, les différents "Genome Browsers" partagent des données brutes (séquence de référence) mais également des données d'annotation. Comme le montre **la figure 1**, il existe ainsi des relations complexes entre les fournisseurs de données et les "Genome Browsers".

Figure 1 : Représentation des liens entre les "Genome Browsers" et les fournisseurs de données.



Rectangle rose = fournisseurs de données : centres de séquençage académiques et privés, centres de séquençage et d'assemblage du projet génome humain, projets de séquençage de génomes personnels (James Watson, Craig Venter ...), projet 1 000 génomes. Rectangle vert

= Genome Browsers. Lignes pointillées = données utilisées par les génomes Browsers.
Flèches rouges = liens entre les différents Genome Browsers.

II.2 L'ANNOTATION : OUTILS ET BASES DE DONNÉES

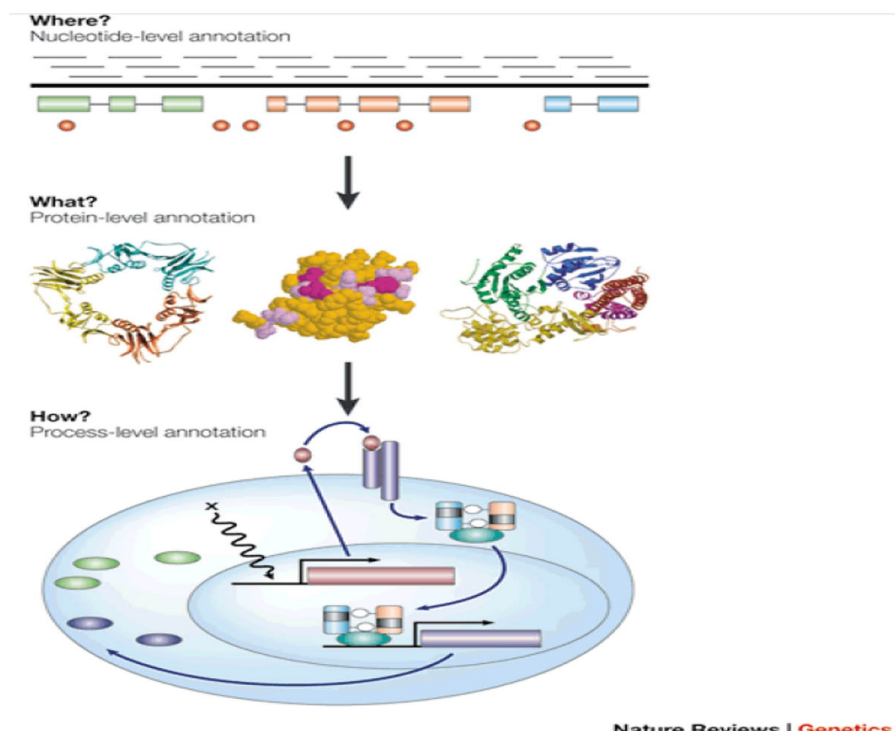
La connaissance de la séquence du génome humain n'aurait qu'une portée limitée si elle n'était annotée à différents niveaux. Ainsi l'annotation est un processus complexe qui peut être subdivisé en trois catégories : l'annotation syntaxique, l'annotation fonctionnelle et l'annotation relationnelle (figure 2) :

L'annotation syntaxique qui permet d'identifier les séquences présentant une pertinence biologique (gènes, signaux, répétitions, ...)

L'annotation fonctionnelle qui permet de prédire les fonctions et produits potentiels des gènes préalablement identifiés (similitudes de séquences, motifs, structures, ...) et de collecter d'éventuelles informations expérimentales (littérature, jeux de données à grande échelle, ...)

L'annotation relationnelle qui permet enfin de déterminer les interactions que les objets biologiques préalablement identifiés sont susceptibles d'entretenir (familles de gènes, réseaux de régulation, réseaux métaboliques, ...).

Figure 2 : Représentation des différents niveaux d'annotation (d'après Lincoln Stein, Nature Reviews Genetics 2, 493-503 2001).



Where? = annotation syntaxique ; What? = annotation fonctionnelle ; How? = annotation relationnelle.

II.3 STRUCTURE DES PROTÉINES

Parmi les différents outils d'annotation fonctionnelle, attachons nous à ceux en relation avec la structure des protéines puisque cette connaissance sera d'un apport primordial pour l'interprétation des mutations responsables de maladies génétiques.

Nous pouvons distinguer plusieurs niveaux dans la description de la structure des protéines :

- **La structure primaire** : elle correspond à la séquence des acides aminés constituant la protéine. Il s'agit d'un assemblage linéaire des acides aminés codés par l'ARN messenger.
- **La structure secondaire** : elle décrit un niveau structural plus complexe : les structures secondaires qui sont représentées par les repliements locaux de la protéine. Elle comporte les structures en hélices (α , 310 , π , type II) et les feuillets (β parallèles et antiparallèles) et enfin les coudes (types I, II, III et γ).
- **La structure tertiaire** : décrit la structure tridimensionnelle de la protéine ou plus précisément d'une forme particulière que peut prendre dans l'espace la protéine d'intérêt dans des conditions expérimentales données et ceci à un temps t .
- **La structure quaternaire** : permet de décrire les interactions entre protéines.

Les différents outils et bases de données que nous avons sélectionnés permettent de collecter les informations en relation avec les protéines à ces différents niveaux (lorsque des informations sont disponibles ce qui est toujours vrai pour la séquence primaire mais peu fréquent pour la séquence tertiaire et encore plus rare pour la séquence quaternaire). Parallèlement à ces données classiques, des annotations complémentaires sont de plus en plus fréquemment disponibles (domaines protéiques en relation avec une structure ou une fonction particulières, structure de protéines mutantes ...). Comme vous le constatez, nous associons ici outils et bases de données qui sont en effet indissociables dans le cas des structures puisque les données brutes ne sont pas directement interprétables par l'homme et nécessitent l'utilisation d'outils de visualisation.

Les plus populaires sont :

- **Uniprot/Swiss Prot/Expasy** (*Uniprot Consortium*)
- **Protein Data Bank** (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*)
- **Topspan** (*Open Protein Structure Annotation Network*)
- **NCBI** (*National Center for Biology Information*)
- **PDBsum** (*European Bioinformatics Institute*)

D'autres bases de données sont particulièrement utiles pour identifier des domaines protéiques présents chez plusieurs protéines et ainsi définir des familles et des superfamilles de protéines :

- **CATH protein structure classification** (*University College London*)
- **Pfam** (*Wellcome trust Sanger Institute*)
- **Protein Information Resource** (*University of Delaware / Georgetown University Medical Center*)
- **Structure Function Linkage Database** (*University of California, San Francisco*)

II.4 LES BASES DE DONNÉES DÉDIÉES AUX MALADIES GÉNÉTIQUES

La base de données de référence pour les maladies génétiques est sans conteste **OMIM** (*Online Mendelian Inheritance in Man*). Cette base de données est née dans les années 1960 grâce au travail de Victor McKusick qui est souvent surnommé "the father of medical genetics" et qui a patiemment et sans relâche démontré l'importance de l'étude des bases génétiques des maladies : "*I like to say that the arrangement of genes on chromosomes is part of the micro-anatomy, just as the gross anatomy in the Middle Ages was important to medicine, every medical specialty now uses mapping genes for diseases*".

Il a également été l'un des premiers à comprendre la puissance de la bioinformatique et la nécessité d'organiser le savoir médical sous la forme de bases de données. La version Internet de son oeuvre a été créée en 1985 et est aujourd'hui encore la référence internationale. Il nous a quittés en 2008.

Parallèlement à OMIM, il existe d'autres bases de données dédiées aux maladies génétiques. Citons par exemple :

- **GeneCards** (*Weizmann Institute of Science*) qui a pour porte d'entrée le gène mais qui permet également d'obtenir des données sur les maladies associées (5551 gènes sont associés à un phénotype clinique).
- **Office of Rare Diseases Research** (*National Institute of Health*). Ce site est dédié aux maladies rares et a un champ d'utilisation non restreint aux scientifiques puisqu'il s'adresse aussi bien aux chercheurs qu'aux cliniciens ou aux patients.
- **Orphanet** (*INSERM*)
- **MEDGENE** (*Harvard Medical School*) Medline

A côté de ces bases de données généralistes, il existe nombre de bases de données dont le champ d'application est plus étroit. Citons par exemple :

- **HuGE Navigator** (*National Office of Public Health Genomics Centers for Disease Control and Prevention*)
- **Infervers** (*Institut de Génétique Humaine - Montpellier*)

II.5 VARIABILITÉ DU GÉNOME HUMAIN

Avec l'essor des nouvelles technologies, le nombre de variations de la séquence du génome humain ne cesse de croître. Ainsi le séquençage du génome complet d'un individu permet aujourd'hui d'identifier environ 3 millions de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) dont 20 à 25% n'ont jamais été décrits auparavant. La collection de ces informations est d'un intérêt majeur, non seulement pour la recherche mais également pour le diagnostic des maladies génétiques.

La grande difficulté est actuellement de collecter des données très hétérogènes tant par leur mode de production (quel technologie a été utilisée ?) que par leur qualité (quels étaient les paramètres qualités employés ?). Comme nous allons le voir, il existe de nombreuses bases de données permettant d'accéder à des informations sur la variabilité de la séquence du génome humain mais il n'existe pas (encore) une base de données idéale.

Deux approches ont été retenues par différents groupes : l'approche généraliste (les données sont collectées pour l'ensemble des gènes) et l'approche spécialisées (les données sont collectées pour un gène donné).

II.5.1 Les bases de données centrales

Elles permettent d'accéder rapidement à des données relatives à la variabilité de séquence d'un gène quelconque.

Nous pouvons distinguer plusieurs types de bases de données en fonction du type de mutation (ici pris dans son sens littéral c'est à dire toute variation stable de la séquence) : celles dédiées aux SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), aux CNVs (*Copy Number Variation*) et celles dédiées aux mutations pathogènes

II.5.1.1 Les bases de données centrales dédiées aux SNPs

Nous illustrerons ce type de base de données avec trois modèles complémentaires :

- **dbSNP** (*National Cancer Bioinformatics Institute*)
- **Allele FREquency Database** (*Yale University*)
- **HapMap** (*Projet international*)

II.5.1.2 Les bases de données centrales dédiées aux CNVs

Les CNVs sont connus depuis longtemps mais l'émergence des technologies à très haut débit comme l'hybridation génomique comparative (CGH) sur puces (microarray CGH) ont véritablement révélé un aspect insoupçonné de la variabilité du génome humain : des variations de fragments de séquence de plusieurs centaines de milliers de paires de bases. Ces données ainsi que leurs conséquences phénotypiques (certains CNVs sont pathogènes, d'autres pas) sont répertoriés dans plusieurs bases de données dont voici quelques exemples :

- **CNVVdb** (*Academia Sinica - Taiwan*)
- **DGV** (*Department of Genetics and Genomic Biology - Toronto*)
- **DECIPHER** (*Wellcome Trust Sanger Institute*) (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resource*)

II.5.1.3 Les bases de données centrales dédiées aux mutations pathogènes

Dans le domaine de la génétique humaine, ce sont bien sûr les mutations pathogènes qui sont de la plus grande importance puisqu'elles sont responsables de maladies génétiques. Leur connaissance est ainsi essentielle tant pour le conseil génétique que pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de pathologies voire même pour la création de nouvelles approches thérapeutiques.

Différentes bases de données ont pour objet de collecter ces mutations pathogènes à l'échelle du génome :

- **HGMD** (*Institute of Medical Genetics - Cardiff*)
- **OMIM** *John Hopkins University - National Cancer Bioinformatics Institute*

II.5.2 Les bases de données spécifiques de locus

Plus connues sous l'acronyme de LSDB (Locus Specific DataBase), elles sont développées par des experts d'un gène ou de maladies et sont donc considérées comme les bases de données de référence pour un gène donné.

Leur qualités principales résident dans la validation des données qu'elles contiennent par des experts du domaine considéré ainsi que par leur exhaustivité (jusqu'à 50% de leur contenu peut correspondre à des soumissions directes non publiées et ainsi absent des bases de données centrales). La liste des différentes LSDBs disponibles via Internet peut être retrouvée sur le site de la Human Genome Variation Society (*HGVS*).

III OUTILS INFORMATIQUES UTILES DANS LE DOMAINE DE LA GÉNÉTIQUE

Comme vous pouvez l'imaginer à la vue du nombre et de la diversité des bases de données disponibles via Internet, les outils bioinformatiques disponibles sont également très nombreux allant de la prédiction de gènes à partir d'une séquence quelconque à l'identification de motifs particuliers (sites de fixation de protéines, etc.) ou à la prédiction du caractère pathogène d'une mutation faux-sens.

Ne pouvant traiter ici l'ensemble des outils bioinformatiques disponibles, j'ai choisi de limiter ce paragraphe aux différents outils de prédiction pouvant être directement utiles pour apporter une aide à l'interprétation du caractère pathogène ou non d'une variation de séquence découverte dans le cadre d'un diagnostic moléculaire. En effet, la révolution génomique (séquençage complet d'un ou plusieurs gènes) aboutie à l'identification de nombreuses variations de séquence et il est souvent difficile d'identifier la ou les mutations réellement pathogènes.

La plupart des gènes humains codent pour des protéines et c'est tout naturellement que les outils de prédiction se sont attachés à la protéine plutôt qu'au gène lui-même à l'exception de quelques outils comme nous le verrons par la suite. Dans une situation idéale, la structure 3D de la protéine est disponible et de nombreux orthologues ont également été décrits. Bien entendu cela est encore loin d'être le cas, limitant ainsi l'intérêt de certains outils.

III.1 PRÉDICTION DES CHANGEMENTS DE STABILITÉ DES PROTÉINES

Tous les outils de cette catégorie nécessitent la disponibilité d'une structure 3D de la protéine elle-même ou de l'un de ses orthologues. Les algorithmes utilisés ont des performances hétérogènes tant en terme de rapidité que de précision. Les plus connus sont

- **Cupsat** (*Cologne University*)
- **FoldX** (*European Molecular Biology Laboratory – Heidelberg*)

III.2 PRÉDICTION DE L'AGRÉGATION DES PROTÉINES

L'agrégation est un terme général qui regroupe différents types d'interactions ou caractéristiques. Ainsi l'agrégation des protéines peut survenir via différents mécanismes et peut être classée de différentes façons : soluble/insoluble, covalence/non-covalence, réversible/irréversible, natif/dénaturé. Elle survient par la formation d'un lien chimique entre 2 (ou plus) monomères : la création de ponts disulfures est un mécanisme fréquent mais d'autres liens peuvent également être

observés comme la formation de bi-tyrosines après un phénomène d'oxydation des tyrosines, etc. Deux outils de prédiction sont souvent utilisés dans ce domaine :

- **Aggrescan** (*Universitat Autònoma de Barcelona*)
- **Tango** (*European Molecular Biology Laboratory – Heidelberg*)

III.3 PRÉDICTION DES RÉGIONS DÉSORDONNÉES

Les régions désordonnées (DR) correspondent à des régions protéiques qui ne possèdent pas de structure tertiaire fixe. Elles sont ainsi partiellement ou totalement non repliées. Il a été démontré que de telles régions étaient impliquées dans une grande variété de fonctions comprenant la reconnaissance de l'ADN, la modulation de la spécificité ou de l'affinité de la liaison à d'autres protéines, l'activation par protéolyse, le contrôle de la demi-vie des protéines etc. Bien que ces régions ne possèdent pas de structure 3-D fixe dans leur état natif, elles vont souvent faire l'objet de transitions entre divers états (DR/3-D) lors d'interactions.

Deux outils peuvent être utilisés pour ces prédictions : PONDR (*Molecular kinetics - Indianapolis*) et Disprot (*Indiana University school of medicine*).

III.4 PRÉDICTION DU CARACTÈRE PATHOGÈNE DES MUTATIONS FAUX-SENS

Les mutations faux-sens représentent plus de la moitié des mutations pathogènes décrites dans les maladies génétiques humaines et plus de la moitié des variations de séquence non-pathogènes. Leur interprétation est souvent délicate ce qui a conduit à la création d'outils de prédiction dont les principaux sont présentés ici :

- **SIFT** (*Craig Venter Institute*)
- **Polyphen** (*Harvard University*)
- **UMD-Predicto** (*INSERM*)

III.5 PRÉDICTION DU CARACTÈRE PATHOGÈNE DES MUTATIONS INTRONNIQUES

Il existe nombre de mutations qui sont localisées aux jonctions intron/exon/intron et il a été démontré qu'elles altèrent l'épissage des introns en détruisant certains signaux clés : les sites donneurs et accepteurs d'épissage. De la même façon, des mutations introniques localisées à distance des exons peuvent être pathogènes par la création de nouveaux signaux d'épissage reconnus par la machinerie cellulaire. Ces sites nouveaux sont nommés sites cryptiques. Enfin, il serait trop restrictif de limiter les signaux d'épissage aux simples sites donneurs et accepteurs d'épissage. Il existe en effet

d'autres signaux qui jouent un rôle clé comme le point de branchement situé en 5' du site accepteur, les ESE (*Exonic Splicing Enhancer*) et ESS (*Exonic Splicing Silencer*) localisés dans les exons, ou les ISE (*Intronic Splicing Silencer*) et ISS (*Intronic Splicing Silencer*) localisés dans les introns.

La connaissance de ces signaux est encore incomplète mais il existe d'ores et déjà des outils de prédiction de ces signaux qui peuvent également prédire l'impact d'une mutation quelconque

(exonique ou intronique) sur les signaux d'épissage. L'outil le plus utilisé est aujourd'hui HSF (*Human Splicing Finder*) qui intègre l'ensemble des algorithmes et matrices de prédiction et permet ainsi de disposer d'un large éventail de prédictions en un seul endroit.

IV EXEMPLES

IV.1 INTERPRÉTATION D'UNE MUTATION SYNONYME

Vous travaillez dans un laboratoire de diagnostic qui s'intéresse au gène LAMA2 et plus particulièrement à la mutation c.7572G>A (p.Glu2534Glu). Vous devez tout d'abord rechercher des données sur le gène LAMA2 et sur les pathologies associées à des mutations du gène LAMA2 et ensuite évaluer le caractère pathogène de cette mutation.

a) Recherche des informations relatives au gène LAMA2. Nous pouvons pour cela utiliser différents navigateurs, nous choisirons dans cet exemple le site du NCBI cliquez sur le lien : (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) , tapez LAMA2 dans le critère de recherche, vous obtenez :

Résultat : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=lama2>

b) Vous avez maintenant accès à de nombreuses bases de données. Cliquez sur OMIM (19 résultats) en haut à droite. Vous obtenez :

Résultat : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim?term=lama2>

c) Cliquez sur le lien *156225 (premier de la liste), vous obtenez :

Résultat : <http://omim.org/entry/156225>

d) Vous apprenez ainsi que le gène LAMA2, localisé sur le brin + du chromosome 6 sur un fragment de 633 kb (129,204,285-129,837,710) code pour la chaîne alpha-2 de la laminine-2. Les mutations de ce gène sont responsables de près de 50% des dystrophies musculaires congénitales ... Pour en savoir plus sur le gène LAMA2 lui-même, cliquez sur Genome dans la table à droite et sélectionner le navigateur),

vous obtenez :

Résultat : http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000196569;r=6:129204286-129837714;t=ENST00000421865)

e) Dans le cadre "Region in details", cliquez sur LAMA2, vous pouvez maintenant accéder à des informations plus détaillées sur le gène et sa structure via le lien ENSG00000196569. Vous obtenez :

Résultat : http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000196569;r=6:129204286-129837714;t=ENST00000421865)

f) Dans la liste des différents transcrits, repérez celui qui possède un CCDS (le premier). Cliquez sur le lien ENST00000421865, vous obtenez :

Résultat : http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000196569;r=6:129204286-129837714;t=ENST00000421865)

g) Dans la liste de gauche "transcript-based displays", vous pouvez maintenant accéder à la séquence des 65 exons du gène. Si vous avez été attentifs, vous constaterez que ce nombre est différent de celui de OMIM qui rapportait 64 exons, nombre erroné décrit lors de l'identification du gène. Cliquez sur exons, vous obtenez alors la séquence de référence du gène LAMA2 ainsi que sa structure intron/exon :

Résultat : http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000196569;r=6:129204286-129837714;t=ENST00000421865)

Dans la liste de gauche "transcript-based displays", si vous cliquez sur "Variations", vous obtenez une liste de variations rapportées dans HGMD et dans dbSNP. Vous constaterez alors que votre mutation est inconnue. Que faire pour avancer ?

Premier élément, positionner la mutation dans le gène. La nomenclature de la mutation vous permet de positionner facilement la mutation c.7572G>A (p.Glu2534Glu) sur la dernière base de l'exon 54. Vous pouvez maintenant utiliser les outils de prédiction. La mutation étant une mutation synonyme, les outils tels que *SIFT* et *Polyphen* ne vous apporteront rien. Vous pouvez éventuellement utiliser le logiciel *UMD* pour bénéficier des prédictions d'UMD Predictor qui vous indiquera alors qu'il s'agit d'une mutation pathogène mais il y a plus simple. Pour cela, utilisez HSF, la dernière base d'un exon faisant en effet parti du site donneur d'épissage, vous pouvez bénéficier des prédictions de cet outil.

Pour cela rendez-vous sur (<http://umd.be/HSF/>)

Choisissez les paramètres suivants :

"**Analysis type**" = "Analyze mutation(s)"

"Number of nucleotide surrounding the exon" = 50

"Choose a sequence by" = "Gene name (e.g. DMD)" et tapez LAMA2 puis dans la boîte, saisissez le nom de la mutation (c.7572G>A)

Vous obtenez de nombreuses prédictions, concentrez-vous sur celles dédiées aux sites d'épissage :

Figure 3 : prédictions de l'impact de la mutation c.7572G>A du gène LAMA2 sur les signaux d'épissage (sites donneurs et accepteurs)

Potential splice sites ↑

HSF Matrices

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
160	c.7561	Acceptor	TGTTCCCTGGAGgt	tgttccctggaaGT	85.42	56.48	NA	Site broken -33.89
161	c.7562	Acceptor	GTTCCTGGAGggt	gttcctggaaagTT	48.12	77.07	NA	New site +60.15
169	c.7570	Donor	GAGgttgggt	GAGgttgggt	84.88	74.3	0	WT site broken -12.46

MaxEnt

Threshold values:
5' Motif: 0 3' Motif: 0

Sequence Position	cDNA Position	5' Motif					3' Motif					
		Ref Motif	Ref Score	Mut Motif	Mut Score	Variation (%)	Ref Motif	Ref Score	Mut Motif	Mut Score	Variation (%)	
169	c.7570	GAGgttgggt	6.36	GAGgttgggt	-0.08	-101.26						
171	c.7572						Ggttggtctggtttttagatgctc	4.81	agttggtctggtttttagatgctc	4.94	+2.7	

Le site donneur d'épissage sauvage est présenté sur fond blanc (sequence position 169). Il est très important de connaître les paramètres de chaque outil pour évaluer la conséquence de la mutation sur les sites d'épissage. Ainsi pour l'algorithme HSF une variation de ± 10% est significative.

Vous constatez qu'avec les 2 algorithmes utilisés (HSF Matrices et MaxEnt) le site donneur sauvage est inactivé par la mutation. Il ne vous reste plus qu'à étudier l'ARN messager pour confirmer ces prédictions.

Avec cet exemple, vous avez vu qu'il était très simple de naviguer entre les différentes bases de données (du NCBI à OMIM et à ENSEMBL) afin d'y collecter des informations à de très nombreux niveaux. Vous avez également constaté qu'il était très simple d'obtenir une prédiction (juste pour cet exemple mais n'oubliez pas qu'il s'agit de prédictions) du caractère pathogène d'une mutation synonyme.

IV.2 INTERPRÉTATION DE MUTATIONS FAUX-SENS

Vous travaillez dans un laboratoire de diagnostic qui s'intéresse au gène FBN1 et vous avez identifié chez 5 malades une série de 6 mutations faux-sens : c.3623T>C

(p.Cys875Arg) ; c.1147G>A (p.Glu383Lys) ; c.8339T>C (p.Leu2780Pro) ; c.3413G>C (p.Cys1138Ser) ; c.6881A>C (p.Glu2294Ala) et c.7016G>A (p.Cys2339Tyr).

Vous devez bien sûr évaluer le caractère pathogène de ces mutations, 5 d'entre elles devant être pathogènes et une non.

a) Vous pouvez dans un premier temps rechercher si certaines de ces mutations ont déjà été décrites. Rendez-vous sur HGMD puis saisissez FBN1 et sélectionner "missense mutations". Vous obtenez les informations suivantes :

Tableau 1: présence des mutations du gène FBN1 dans la banque centrale HGMD

Mutation	HGMD
c.3623T>C (p.Cys875Arg)	Non
c.1147G>A (p.Glu383Lys)	Non
c.8339T>C (p.Leu2780Pro)	Oui
c.3413G>C (p.Cys1138Ser)	Non
c.7048A>G (p.Ile2350Val)	Non
c.7016G>A (p.Cys2339Tyr)	Oui

b) Vous ne disposez que d'informations pour 33% de vos mutations. Si vous vous rendez sur Ensembl comme dans l'exemple précédent, vous ne récupérez aucune information nouvelle, c'est à dire qu'aucune des 4 mutations restantes n'est documentée dans dbSNP. Vous n'en saurez pas plus en passant par d'autres bases de données centrales (Swissprot, etc.). Rendez-vous alors sur HGVS ((<http://www.hgvs.org/dblist/glsdb.html>) - F). Vous découvrez qu'il existe une LSDB dédiée au gène FBN1, rendez-vous y (<http://www.umd.be/FBN1>). Vous constaterez alors que toutes les mutations y sont rapportées, 5 étant considérées comme pathogènes et une comme polymorphisme. Cela simplifie considérablement votre travail !

Attention, si vous ne connaissez pas la qualité de la LSDB à laquelle vous venez de vous connecter, vous pouvez néanmoins aller plus loin et utiliser les logiciels de prédiction.

Dans tous les cas, reportez-vous à la publication d'origine pour évaluer la pertinence des arguments qui ont permis aux auteurs de décrire la mutation comme une mutation pathogène ou un polymorphisme. Utilisez donc les trois outils de prédiction les plus connus : SIFT, Polyphen et UMD Predictor (via la LSDB UMD-FBN1).

Utilisez le "NCBI GI number" 281485550 pour SIFT

(http://sift.bii.aster.edu.sg/www/SIFT_BLink_submit.html)

Utilisez le "Protein identifier" 281485550 pour Polyphen

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>)

Pour UMD Predictor suivez le lien <http://www.umd.be/FBN1/> puis consultez chaque fiche individuellement, au total, vous devriez obtenir :

Tableau 2 : bilan des prédictions obtenues avec les systèmes SIFT, Polyphen et UMD-Predictor.

Mutation	SIFT	Polyphen	UMD-Predictor
c.3623T>C (p.Cys875Arg)	Non pathogène	<i>Probablement pathogène</i>	<i>Pathogène</i>
c.1147G>A (p.Glu383Lys)	Non pathogène	Non pathogène	<i>Pathogène</i>
c.8339T>C (p.Leu2780Pro)	<i>Pathogène</i>	<i>Probablement pathogène</i>	<i>Probablement pathogène</i>
c.3413G>C (p.Cys1138Ser)	<i>Pathogène</i>	<i>Probablement pathogène</i>	<i>Pathogène</i>
c.7048A>G (p.Ile2350Val)	<i>Non pathogène</i>	<i>Benign</i>	<i>Non pathogène</i>
c.7016G>A (p.Cys2339Tyr)	Non pathogène	<i>Probablement pathogène</i>	<i>Probablement pathogène</i>

En gras sont présentées les prédictions incorrectes, en italique, les prédictions correctes

Comme vous le constatez à la vue de ce tableau, les prédictions sont différentes d'un système à l'autre. Dans cet exemple très limité, seul l'un des 3 systèmes atteint 100% de bonnes prédictions.

Attention, cela ne veut pas dire que les autres systèmes ne peuvent pas fournir de meilleures prédictions dans d'autres situations.

En conclusion, l'utilisation de bases de données couplée aux outils informatiques librement accessibles via Internet a permis d'obtenir une aide précieuse à l'interprétation des résultats générés dans le cadre d'un diagnostic.

La Trisomie 21

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Renaud Touraine,

Service de génétique clinique, chromosomique et moléculaire, CHU Saint Etienne

Bénédicte de Fréminville,

Service de génétique clinique, chromosomique et moléculaire, CHU Saint Etienne

Damien Sanlaville,

Service de Cytogénétique Constitutionnelle, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Lyon,
Université Claude Bernard Lyon1.

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Fréquence.....	4
II	Dépistage prénatal.....	4
	NOTE(S) DU CHAPITRE	8
III	Signes cliniques après la naissance.....	9
	III.1 A la naissance.....	9
	III.2 Complications et évolution.....	10
	III.2.1 Malformations.....	11
	III.2.2 Développement psychomoteur et comportement.....	11
	III.2.3 Croissance et Endocrinologie.....	11
	III.2.4 Hémato et cancérologie.....	12
	III.2.5 Immunologie et Infectieux.....	12
	III.2.6 ORL.....	12
	III.2.7 Apnées du sommeil.....	13
	III.2.8 Ostéo-articulaire.....	13
	III.2.9 Neurologie.....	13
	III.2.10 Ophtalmologie.....	14
	III.2.11 Bucco-dentaire.....	14
	III.2.12 Digestif.....	14
	III.2.13 Dermatologie.....	14
	III.2.14 Vieillesse et Espérance de vie.....	14
IV	Aspects génétiques : Mécanisme et Conseil génétique.....	16
	IV.1 Mécanisme.....	16
	IV.2 Conseil génétique.....	16
	IV.2.1 T21 libre et homogène ou T21 libre et en mosaïque.....	16

IV.2.2 T21 non libre (par translocation ou inversion ..)	17
IV.2.3 Pour une personne porteuse de trisomie 21	17
V Traitement	18
V.1 Accompagnement kinésithérapique	18
V.2 Accompagnement psychomoteur	18
V.3 Accompagnement orthophonique	19
V.4 Accompagnement psychologique	20
V.5 Accompagnement éducatif	20
V.6 Autodétermination	21

Résumé

La trisomie 21 reste la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle avec une fréquence en France de l'ordre de 1/1500 à 1/2000 naissances. En l'absence de dépistage prénatal elle représenterait environ 10% des déficiences intellectuelles, avec une fréquence d'environ 1/800 naissances. C'est une anomalie chromosomique définie par la présence en 3 copies au lieu de deux de tout ou partie du chromosome 21, dans l'immense majorité des cas accidentelle. Le seul facteur de risque reconnu est l'augmentation de l'âge maternel. La trisomie 21 augmente la probabilité de certaines malformations ou complications médicales dont aucune n'est pathognomonique. Ceci justifie un suivi médical systématique orienté.

La déficience intellectuelle est le plus souvent légère, permettant dans au moins la moitié des cas l'acquisition de la lecture et une certaine autonomie en milieu ordinaire. Il n'y a actuellement pas de traitement de cette anomalie chromosomique et de ses conséquences cognitives, mais la 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 et, pour une grande part d'entre elles, de parvenir à un certain degré d'autonomie en milieu ordinaire. Les autres, en raison d'une moins bonne autonomie ou d'un choix de vie familial ou personnel, vivront dans un milieu plus protégé. L'espérance de vie est actuellement supérieure à 55 ans, limitée par le développement d'une démence de type Alzheimer dans 30 à 40% des cas.

I FRÉQUENCE

La fréquence de la trisomie 21 (T21) est classiquement de 1/800 naissances. En fait ce chiffre n'est plus d'actualité dans les pays où le dépistage et le diagnostic prénatal ont été mis en place faisant diminuer le nombre de naissances de bébé porteur de trisomie 21 : il est plutôt entre 1/1500 et 1/2000 naissances en France. De grandes variations sont observées d'une région à l'autre et selon les pratiques religieuses et le niveau socio-économique. Il faut rappeler que le risque de trisomie 21 est le même dans toutes les populations, sans différence ethnique, mais, selon la population, l'accès au prénatal est variable.

On estime qu'en France actuellement, s'il n'y avait pas de diagnostic prénatal, la fréquence serait plutôt de 1/500 naissances, du fait de l'âge plus tardif des grossesses qu'auparavant. En effet, le seul facteur de risque reconnu de trisomie 21 est l'âge maternel : environ 1/1000 naissances à 30 ans, il est de 1/100 à 40 ans, pour les trisomie 21 libres.

En pratique, la fréquence de la trisomie 21 à la naissance, même si elle a diminué, reste relativement élevée et reste la première cause reconnaissable de déficience intellectuelle et l'anomalie chromosomique source de difficultés la plus fréquente en période post-natal. On estime qu'il naît 1 à 2 bébés trisomiques 21 chaque jour en France. Ceci ne devrait pas changer dans les 10 ans qui viennent, puisqu'il est peu probable que le taux de dépistage prénatal augmente significativement. Ce taux dépend aussi du choix qu'à 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, la grande majorité des couples vont jusqu'à l'IMG (environ 90-97%). 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).

II DÉPISTAGE PRÉNATAL

La France est le pays où le dépistage prénatal de la T21 est le plus organisé car devant être proposé à toutes les femmes enceintes et pris en charge par l'assurance maladie.

Ce dépistage, utilisant les marqueurs sériques, est scientifiquement un des plus mauvais exemple de dépistage : nombreux faux positifs, nombreux faux négatifs, absence de vrai traitement pour la situation dépistée. Les dosages sont modérément reproductifs (à quelques jours d'intervalle, même si on est dans la période de dépistage possible, le risque calculé peut varier de 1/150 à 1/300). De plus la réalisation de ce dépistage induit des amniocentèses et donc des pertes fœtales (risque d'environ 0,5 %).

Depuis Janvier 2010, le dépistage prénatal de la T21 a recours aux marqueurs sériques du

1er trimestre préférentiellement ou du 2ème trimestre, associés à la mesure de la clarté de la nuque foetale à l'échographie du 1er trimestre (voir sur le site web du CPDPN¹ du CHU de St Etienne : taper sur Google "CPDPN 42" ou (http://www.chu-st-etienne.fr/default.aspx?mon_motcle1=reseaux&mon_motcle2=cpdpn)).

Les marqueurs sériques du risque de T21 :

Ce sont des substances dosées dans le sang maternel dont la distribution du dosage est différente selon que le fœtus est T21 ou pas. Par exemple le dosage de β HCG tend à être plus élevé lorsque le fœtus est 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 1er trimestre (entre 11 SA² et 13SA+6 jours) : β HCG et PAPP³
- Marqueurs du 2ème trimestre (entre 14 SA et 17SA + 6 jours) : HCG ou β HCG et α FP (et éventuellement estriol)

Ces MS⁴ 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 seulement dans 1% des cas une T21.

La clarté de la nuque du fœtus :

Petite zone de densité liquidienne entre la peau et les plans profonds musculosquelettiques, mesurée sur l'échographie du 1er trimestre, sur une coupe de profil. Elle est physiologique et tend à diminuer après le 1er 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 et 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 (LCC : longueur cranio-caudale) un chiffre d'augmentation (ou de diminution) du risque de T21.

En cas de clarté augmentée sans anomalie chromosomique, il faut surveiller étroitement le développement fœtal à l'échographie car il y a un risque de quelques pourcents de détecter à 17 SA ou 22 SA un problème de croissance ou de syndrome malformatif (en particulier avec malformation cardiaque). S'il n'y a pas d'anomalie chromosomique et que l'évolution fœtale est favorable, il est très probable que cet enfant ira bien après la naissance (on rejoint presque le pronostic des fœtus dont la clarté nucale était fine).

Il ne faut pas confondre cette mesure de la clarté nucale au 1er trimestre avec les augmentations possible au 2ème trimestre : celles-ci permettent bien moins de dépister les T21 et se voient plus dans des contextes malformatifs ou d'anasarque.

En pratique :

On préconise (la femme enceinte/le couple décide) la réalisation d'un calcul de risque de T21 à partir des 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 1er trimestre).

On parlera de dépistage combiné (mesure nuque T1⁵+ MS T1 et âge maternel) et de dépistage séquentiel (mesure nuque T1 + MS T2 et âge maternel).

Pour la réalisation de ce dépistage :

- Le médecin qui mesure la nuque à l'échographie du 1er 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 (1/50, 1/100, 1/200...), on considère que le fœtus est à risque accru de T21 et la vérification du 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 (1/300, 1/1000, ...) le risque de T21 est considéré comme faible chez le fœtus, mais il n'est pas nul et des fœtus T21 ne seront pas détectés.

Les indications pour lesquelles une vérification du caryotype fœtal, par PVC ou amniocentèse, est prise en charge par l'assurance maladie dans ces cas sont:

- Risque de T21 augmenté sur le dépistage combiné ou séquentiel
- Risque de T21 augmenté sur les MS T2
- Age maternel supérieur à 38 ans au moment de la ponction si ni le dépistage combiné ou séquentiel ni les MS T2 n'ont pu être réalisés (donc uniquement en cas de découverte tardive de la grossesse). L'amniocentèse pour les femmes de plus de

38 ans n'est donc plus "automatique". On rappelle que dans le calcul de risque combiné ou séquentiel ou des MS T2 seuls, l'âge maternel est pris en compte. Etablissement du sexe chromosomique en cas de DPN d'une affection liée à l'X

- Anomalies échographiques fœtales autres que la clarté de la nuque :
 - Malformations comportant un risque assez marqué d'anomalie chromosomique dont la T21, comme le CAV⁶, l'atrésie duodénale, l'absence de visualisation des os propres du nez.
 - Malformations ayant un risque moindre mais pouvant justifier une vérification du caryotype fœtal : par exemple une CIV⁷, une duplication digestive, une agénésie du corps calleux, ...
 - Les "petits" signes du deuxième trimestre n'ont pas de valeur individuellement: profil plat, clinodactylie du 5^{ème} doigt, fémur court ... et ne sont pas spécifiques de la trisomie 21.
- Antécédents d'anomalie chromosomique lors d'une précédente grossesse du couple
- Présence d'une anomalie chromosomique chez un des membres du couple

Dans ces cas il peut y avoir vérification du caryotype fœtal pris en charge, par PVC vers 12-14 SA, ou amniocentèse à partir de 16 SA.

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 fœto-placentaires (de l'ordre de 1-2%) des PVC. Ces discordances peuvent conduire au diagnostic erroné d'anomalie chromosomique fœtale alors que l'anomalie est limitée au placenta et le fœtus indemne. Inversement, mais plus rarement, elle pourrait être faussement normale (en particulier en cas de T21 en mosaïque).

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 2 à 3 semaines. On peut réaliser une technique plus rapide sur l'amniocentèse en utilisant la technique d'Hybridation in Situ en Fluorescence (FISH) avec une sonde spécifique du chromosome 21 sur noyaux en interphase. La présence de 3 signaux d'hybridation signe une trisomie 21. 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 trisomie 21.

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,...)

Se rappeler qu'un bébé porteur de trisomie 21 peut naître malgré tout, avec une nuque fine au premier trimestre, des marqueurs sériques ne montrant pas de risque augmenté et une absence de malformation.

La femme enceinte / le couple a le choix de la décision de faire le dépistage et d'interrompre ou non la grossesse en cas de trisomie 21. Dans la loi sur les IMG, aucune liste de situations justifiant le recours à l'IMG n'est donnée. On y parle seulement de "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, cette IMG pour *raison fœtale* doit être acceptée par deux médecins faisant partie d'un CPDPN, qui signeront le certificat autorisant l'IMG. 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.

NOTE(S) DU CHAPITRE

CPDPN : Centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal

SA : Semaines d'aménorrhée

PAPPA : pregnancy associated plasma protein A

MS : Marqueurs sériques

T1 : 1er trimestre, *T2* : 2ème trimestre

CAV : Canal atrioventriculaire

CIV : Communication interventriculaire

III SIGNES CLINIQUES APRÈS LA NAISSANCE

La Trisomie 21 peut entraîner beaucoup de signes ou de complications, mais toutes ne se rencontrent pas chez toutes les personnes porteuses de trisomie 21.

Les symptômes les plus constamment rencontrés sont l'hypotonie, visible dès la naissance, et la déficience intellectuelle.

III.1 A LA NAISSANCE

Du fait du dépistage prénatal, on a maintenant deux situations :

- Les enfants dont le diagnostic ou la suspicion a été porté pendant la grossesse
- Les enfants n'ayant pas eu de dépistage ou « faux négatifs » du dépistage : beaucoup n'ont pas de malformation

L'hypotonie est un des signes les plus constants, mais elle peut être modérée, plus particulièrement chez les Africains.

On retrouve généralement des signes morphologiques dont les plus fréquents en période néonatale sont :

- Hypotonie
- Absence du réflexe de Moro
- Profil plat
- Fentes palpébrales obliques en haut et en dehors
- Anomalies des oreilles (petites et rondes)
- Nuque plate avec excès de peau
- Hyperlaxité articulaire et cutanée
- Brachymésophalangie des 5^o doigts = clinodactylie
- Pli palmaire transverse unique
- Espacement accru entre orteil I et II et une plante des pieds plissée

On peut aussi noter un visage rond avec un crâne petit et rond, un petit nez en boule, des tâches de Brushfield sur l'iris, une tendance à la protrusion de la langue qui est plicaturée, des mains un peu carrées avec excès de peau, des doigts courts, un livedo.

III.2 COMPLICATIONS ET ÉVOLUTION

L'hypotonie évolue mais reste présente toute la vie, et l'hyperlaxité est un élément important du tableau clinique également. L'hypotonie participe au retard des acquisitions motrices mais n'en est pas la seule cause.

Un certain nombre de complications médicales 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.

Il faut souligner une différence vis-à-vis de la douleur et de sa perception : 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 vont moins se plaindre et ont des difficultés à dire 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, devant des troubles du comportement, une baisse de l'état général, une cassure staturo-pondérale, un replis, des refus, des troubles du comportement.... Un programme de suivi médical a été publié par certains d'entre nous avec l'association TRISOMIE 21 France : voir le tableau résumé ci-dessous.

Tableau : Trisomie 21

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 1/5ans
ORL- Audition	à 6 m et 1 an	1/an	1/an	* ou 1/3ans	* ou 1/3ans
Apnées du sommeil	*	*	*	*	*
Ophthalmologie	naiss et 9 m	1/an	1/an	1/an	1/an
Thyroïde	à 6 m et 1 an	1/an	1/an	1/an	* ou 1/3ans
Diabète	*	*	*	1/2ans	* ou 1/2ans
Hygiène dentaire et soins (dentiste)		1/an	2/an	3/an	3/an
Développement orofacial (dentiste et/ou orthodontiste)	entre 6 m 1 an #	1/an §	vers 4 ans puis selon avis §	vers 12 ans puis selon avis §	
Maladie cœliaque	à 6 mois	*	*	*	* ou 1/3ans
Orthopédie	*	*	*	*	* ou 1/5ans
RX atlas-axis			à 6 ans	à 12/13 ans	*
Gynécologie				1/2ans	* ou 1/2ans
Prise en charge paramédicale	oui vers 3 mois	oui	oui	oui	oui par périodes

* : Selon la symptomatologie ou devant baisse état général ou perte des acquis
 AO : calcul de l'âge osseux
 # : Consultation d'information
 § : En l'absence de besoins particuliers déjà identifiés

III.2.1 Malformations

Certaines malformations sont plus fréquentes

- Cardiaques (30 à 40% des cas). La plus commune est le canal atrio-ventriculaire (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, Hirschsprung (megacolon aganglionnaire), pancréas annulaire, atrésie anale, ...
- Rénales : malformations banales (reflux vesico-urétéral, syndrome de la jonction, duplications, ...), parfois hypospade.
- Les malformations cérébrales sont possibles mais rares.
- Malformations de l'oreille moyenne et interne

III.2.2 Développement psychomoteur et comportement

Le retard mental est de degré léger à modéré. La distribution du QI chez ces personnes est gaussienne, il y a donc de rares cas de retard limite ou presque absent et à l'inverse des retards sévères. Mais les capacités intellectuelles d'un individu sont en fait le résultat d'une interaction permanente entre les dispositions innées et les expériences personnelles et apprentissages faits tout au long de l'existence. On estime qu'environ la moitié des personnes porteuses de trisomie 21 sont capables d'accéder à la lecture et l'écriture et à une assez bonne autonomie.

Il y a un peu plus de troubles du comportement que dans la population générale, mais moins que chez les autres personnes ayant une déficience intellectuelle. Des traits autistiques ou un autisme sont possible.

III.2.3 Croissance et Endocrinologie

Il y a fréquemment un petit retard de croissance intra utérin, mais modéré, n'appelant pas forcément l'attention en fin de grossesse. 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.

Il y a fréquemment une obésité ou un surpoids 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 la déglutition), l'hygiène et les soins dentaires, 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 trisomie 21, surtout chez l'homme, mais on manque de données objectives. Au moins un cas de paternité et plusieurs maternités ont été décrites. 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 dispositif sous-cutané de type Nexplanon®, qui risque d'accentuer le surpoids et entraîne un « spotting » mal vécu. Le stérilet est également utilisable, stérilet au levonorgestrel.

III.2.4 Hémato et cancérologie

Une polyglobulie à la naissance n'est pas rare, elle est transitoire.

Environ 1 à 3% des enfants trisomiques 21 développent avant l'âge de 4 ans une leucémie aiguë megakaryocytaire (LAM7), et parmi ceux-ci, beaucoup, avaient présenté une prolifération myéloblastique les premiers mois de vie. Cette prolifération généralement transitoire et pouvant être asymptomatique concerne environ 10% des nourrissons T21. La LAM7 est 500 fois plus fréquente que dans la population ordinaire, et elle répond assez bien au traitement chimiothérapique chez les enfants trisomiques 21. Le risque d'autres leucémies est également augmenté, mais le risque de la plupart des tumeurs solides, en dehors du cancer du testicule, est diminué tant chez l'enfant que l'adulte.

III.2.5 Immunologie et Infectieux

Il existe un surcroît d'infections généralement banales, broncho-pulmonaires ou ORL, en particulier les otites sont plus fréquentes. Le plus souvent aucun déficit immunitaire n'est mis en évidence, et dans les cas où ce bilan est perturbé, il n'y a pas de profil spécifique à la trisomie 21.

III.2.6 ORL

On a déjà mentionné le risque augmenté d'otites. 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 l'audition doit impérativement être contrôlée régulièrement. Il peut s'agir aussi de surdités de perception.

III.2.7 Apnées du sommeil

Très probablement fréquentes (30 à 50 %, tant chez l'adulte que l'enfant), d'origine centrale éventuellement, mais plus souvent obstructives, elles nécessitent un dépistage régulier. Un bilan ORL est nécessaire pour poser l'indication d'adénoïdectomie ou d'amygdalectomie si nécessaire. Toutefois l'hypotonie oro-laryngée et l'obésité sont aussi des facteurs favorisant l'obstruction. Pour les apnées obstructives l'indication d'appareillage avec pression positive continue nocturne doit être posée si elle s'avère nécessaire : elle est alors en général assez bien acceptée avec amélioration de la fatigue et de l'endormissement diurne, et plus de vitalité...

III.2.8 Ostéo-articulaire

La laxité articulaire est augmentée, et est le principal facteur des problèmes ostéo-articulaires dans la trisomie 21. En bref nous citerons la scoliose, la luxation de hanche, le genu valgum, l'instabilité femoro-patellaire, les pieds plats, et l'hallux valgus ou varus. L'atteinte de la charnière cervico-occipitale est classique mais heureusement les complications neurologiques sont peu fréquentes (1% des personnes T21). Le risque en effet est celui d'une myélopathie cervicale. On peut essayer sur des clichés dynamiques de mesurer l'instabilité ou la laxité de C1/C2, 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. Donc une radio normale n'est pas une garantie. Néanmoins des radiographies peuvent parfois dépister quelques anomalies : malformations vertébrales (os odontoïdeum par exemple) ou un espace médullaire est <13 mm. Aussi au moins 1 série de radios dynamiques entre 5 et 15 ans, répétées 1 ou 2 fois à 5 ans d'intervalle (le risque avant l'âge de 5 ans est extrêmement faible). Radios à faire selon la pratique sportive envisagée ou avant anesthésie générale. Au cours de cette dernière toujours faire attention à l'axe tête-cou.

L'arthrose est plus précoce et il peut y avoir des lésions vertébrales importantes, pouvant entraîner des compressions nerveuses chez l'adulte.

III.2.9 Neurologie

Le risque d'épilepsie est augmenté, en particulier de syndrome de West chez le nourrisson et d'épilepsie généralisée à l'âge adulte. Après l'âge de 35 ans, le début d'une épilepsie peut être le premier signe d'une démence de type Alzheimer débutante, ou survenir au cours de l'évolution de celle-ci.

III.2.10 Ophtalmologie

Les simples troubles de réfraction sont fréquents. Il y a plus de cataractes congénitales, mais aussi de cataractes séniles de survenue plus précoce.

Là encore un suivi régulier est indispensable toute la vie.

III.2.11 Bucco-dentaire

Le développement de l'étage moyen de la face est moindre et avec l'hypotonie et les éruptions dentaires qui sont souvent retardées et anarchiques, une perturbation précoce des fonctions orales (succion, mastication, déglutition) existe. L'hypotonie linguale et une bouche plus petite donnent une fausse impression de macroglossie et entraînent un prognathisme relatif. Les rééducations doivent prendre en charge ces aspects pour améliorer la tonicité buccofaciale. Il peut exister en outre des agénésies dentaires et des anomalies morphologiques des dents. Enfin la moindre capacité du système immunitaire associée peut-être à des particularités des muqueuses favorise les caries, les parodontopathies, les aphtes, la perlèche ...

III.2.12 Digestif

Le RGO est très fréquent, favorise l'inflammation du carrefour aéro-digestif et les apnées du sommeil, les surinfections bronchiques.

On a déjà mentionné le Hirschsprung et l'intolérance au gluten.

Il existe une tendance à la constipation mais rechercher une hypothyroïdie.

III.2.13 Dermatologie

On observe des lésions assez fréquentes de folliculite et la peau est sèche, plus rarement une lésion particulière : l'élastome serpiginieux perforant.

III.2.14 Vieillesse et Espérance de vie

La durée de vie des personnes porteuses de trisomie 21 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, probablement à 60 ans. Elle reste toutefois inférieure à celle de la population générale du fait d'une mortalité augmentée, principalement, par certaines malformations cardiaques et par la démence précoce.

Par ailleurs, les tissus vieillissent plus vite que chez les personnes ordinaires, comme la peau et les articulations, probablement en rapport, entre autres, avec des particularités de la matrice extra cellulaire. Ainsi, l'arthrose peut être présente dès 25 ans.

Il existe un certain déclin cognitif physiologique, plus précoce que chez les personnes ordinaires. Il est d'origine multifactorielle et l'impact d'une vie sociale et professionnelle moins riche est certain. Au moins entretenir les acquis, et si possible continuer à en développer de nouveaux, est important à l'âge adulte.

On l'a mentionné, une démence de type Alzheimer est fréquente, survenant 30 à 40 ans plus tôt que dans la population générale. On estime que les personnes trisomiques 21 de plus de 35 ans ont un risque de 30 à 40% de développer cette démence dans les années qui suivent, mais il est certain que toutes ces personnes ne développent pas une démence, même à 70 ans. Il faut savoir que toutes les personnes porteuses de trisomie 21 présentent des lésions histologiques cérébrales d'Alzheimer (plaques et dégénérescence neurofibrillaire) à partir de 30 ans. Ceci et le développement d'une atteinte clinique chez un grand nombre, est certainement en rapport avec la présence sur le chromosome 21 du gène APP, codant pour la protéine β -amyloïde. La surexpression du gène APP conduisant à une accumulation plus précoce de cette protéine. La surexpression d'autres gènes du chromosome 21 pourrait avoir un rôle également. Une épilepsie n'est pas rare, lors de l'évolution de la démence, parfois débutant dès la phase initiale. Le diagnostic de démence est moins aisé que dans la population ordinaire de par le déficit cognitif préalable, mais il est réalisable par les équipes expérimentées, si besoin en s'appuyant sur des outils spécifiques (par exemple l'échelle de Gedye).

En pratique il est fréquent d'être confronté à un déclin, un repli, chez ces adultes, surtout après 30-35 ans : il faut alors rechercher toutes les causes possibles accessibles à un traitement 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 coeliaque, 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 les troubles psychiatriques, dépression en particulier.

Si finalement il s'agit d'une démence, 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 œuvres pour les personnes démentes non trisomiques.

IV ASPECTS GÉNÉTIQUES : MÉCANISME ET CONSEIL GÉNÉTIQUE

IV.1 MÉCANISME

95 % = Trisomie 21 libre

47,XY,+21 47,XX,+21

Le plus souvent homogène, rarement en mosaïque (2% des cas)

5% = Trisomie 21 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% 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 trisomie 21 partielle résultant de la mal ségrégation d'une translocation réciproque présente chez un des parents et impliquant le chromosome 21 ou d'une aneusomie de recombinaison d'une inversion du 21 présente chez un des parents.

IV.2 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 :

IV.2.1 T21 libre et homogène ou T21 libre et en mosaïque

Origine "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 2 chromosomes 21 au lieu d'un seul, soit dans l'ovule soit dans le spermatozoïde. En fait c'est plus souvent dans l'ovule : 90% sont d'origine maternelle. La majorité des T21 proviennent d'une non-dysjonction méiotique maternelle lors de la 1ère mitose de méiose

Le risque de récurrence dans ces cas est très faible, au maximum de 1% avant l'âge de 40 ans, égal au risque de l'âge maternel après 40 ans. Il y a donc une faible augmentation du risque avant l'âge de 40 ans. Ceci parce que certains couples ont un facteur prédisposant supplémentaire à l'âge maternel (dans de très rares cas il peut y avoir une mosaïque germinale de T21 chez un des 2 parents, sinon peut-être il y a-t-il d'autres facteurs favorisant les non-dysjonctions, mais ils n'ont pas été identifiés avec certitude). Ainsi pour la très grande majorité des couples, le fait d'avoir un enfant trisomique ne modifie pas leur risque. Mais comme on ne peut distinguer ces couples de ceux qui ont vraiment un risque supplémentaire, on donne ce petit risque accru global de l'ordre de 1%.

De toutes façons, pour toutes leurs futures grossesses, ce couple pourra avoir, s'il le souhaite, une vérification du caryotype fœtal (en général par amniocentèse), prise en charge par la sécu.

IV.2.2 T21 non libre (par translocation ou inversion ◀)

Il est hautement souhaitable de vérifier le caryotype des 2 parents. Dans la moitié des cas l'un des deux parents a une anomalie chromosomique équilibrée. Pour les autres cas, il s'agit alors d'une anomalie de novo chez l'enfant, le risque de récurrence pour les autres grossesses du couple est là aussi faible, maxi 1% ...

Mais en cas d'anomalie équilibrée chez un des 2 parents, le risque de récurrence est plus élevé, variable selon l'anomalie et le sexe du parent porteur de cette anomalie. En général, risque de l'ordre de 5-10% (mais peut aller jusqu'à 100% dans les exceptionnelles translocations robertsoniennes 21-21).

Là encore, vérification possible du caryotype fœtal, si le couple le souhaite, pour toutes les futures grossesses, par amniocentèse ou parfois PVC.

IV.2.3 Pour une personne porteuse de trisomie 21

Pas de différence clinique selon l'anomalie chromosomique, sauf pour les très faibles mosaïques (si le % de cellules trisomiques est faible, moins de 10% par exemple) et pour certaines très rares T21 partielles ...

La plupart des hommes T21 sont dits "stériles", mais cela ne repose sur aucune étude récente fiable, donc en fait on ne sait pas très bien. Il y a eu très peu de cas de naissances d'un père T21, mais il y en a eu.

La fertilité chez les femmes T21 est réduite mais des grossesses sont possibles et un certain nombre de grossesses ont été décrites.

Dans les 2 cas, une personne avec une T21 va fabriquer des cellules germinales dont statistiquement la moitié a 2 chromosomes 21 au lieu d'un seul. Donc ces personnes ont un risque augmenté d'avoir un enfant avec une T21, en fait, ce risque semble être de l'ordre de 30% et pas 50% (pertes embryonnaires précoces).

Ce problème de procréation des personnes porteuses de trisomie 21 (et globalement de toutes les personnes déficientes mentales) est extrêmement difficile complexe et délicat, et nous ne l'aborderons pas ici.

V TRAITEMENT

La prise en charge précoce (kinésithérapie, psychomotricité, orthophonie, aide éducatrice), commence à partir de 3 à 4 mois. 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 : (<http://www.trisomie21-france.org>)

V.1 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.

Le projet est construit et réévalué régulièrement et individuellement pour chaque enfant en fonction de la prescription médicale et du bilan kinésithérapique.

Il faut solliciter la pratique régulière d'activités physiques qui seront un relais ensuite à la kinésithérapie

La kinésithérapie est souvent arrêtée à l'âge de la marche **alors que les bénéfices à la poursuivre sont majeurs** sur la tonicité et la motricité globales, la motricité fine, l'acquisition de l'équilibre, la tonification bucco-faciale. Elle prépare aussi à la pratique régulière d'activités physiques mais il est indispensable de faire régulièrement un bilan moteur et statique pour surveiller l'évolution corporelle et les capacités motrices.

V.2 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, ceci en :

- Estimant ses possibilités, et les indices d'hétérogénéité dans son développement

- Valorisant son potentiel, ses compétences et son désir d'expérience
- Accompagnant les domaines les plus en retrait afin d'augmenter ses chances d'adaptation
- Veillant à l'expression des difficultés dans le temps et à leurs implications affectives
- Identifiant, et prévenant les périodes sensibles lorsqu'il est confronté à des situations sociales ou d'apprentissage qui le mettent en difficulté.

Une attention particulière est portée sur l'adaptation de l'enfant au sein de la collectivité, sa compréhension des situations sociales, de jeux et sa capacité à construire sa place.

Un travail peut être maintenu chez l'**adolescent** en fonction de ses choix et des demandes particulières qu'il peut formuler. Soit à partir d'objectifs d'autonomie que l'adolescent 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.

V.3 ACCOMPAGNEMENT ORTHOPHONIQUE

Il existe une problématique langagière spécifique à la Trisomie 21, avec en plus des difficultés d'articulation, concourant à une moindre intelligibilité de la parole, non corrélés avec le niveau de compréhension.

L'objectif global de cette éducation précoce est, avant tout, d'accompagner un très jeune enfant dans la mise en place de la communication, sans visée normative, et de l'aider, à exprimer, à son rythme, l'ensemble de ses potentialités. L'orthophoniste est là aussi pour aider les parents à mieux interagir avec cet enfant dont l'hypotonie atténue les signes de communication, à savoir utiliser des stimulations, tout en restant les "parents" de cet enfant, pour lui permettre de prendre sa place d'interlocuteur.

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 qui peuvent conserver de grosses difficultés de langage et de parole. Au fil des années, l'accompagnement orthophonique se poursuit en individuel ou en groupe pour accompagner l'enfant, l'adolescent et l'adulte dans sa scolarité et sa vie sociale et professionnelle qu'elle soit en milieu ordinaire ou protégé.

V.4 ACCOMPAGNEMENT PSYCHOLOGIQUE

L'accompagnement psychologique et social de la personne trisomique s'organise autour de deux axes complémentaires :

- **La famille**

Comme pour tout enfant, elle constitue "le" cadre primordial de développement de l'enfant trisomique. Dès l'annonce du diagnostic (en prénatal ou en postnatal), la famille aura à entamer le cheminement douloureux et souvent long qui lui permettra de se réorganiser pour donner à "son" enfant trisomique la place qui lui convient dans la structure familiale. 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 fratrie**.

- **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, en repérant les personnes et les structures sur lesquelles il peut s'appuyer. Les accompagnements éducatif et psychologique sont importants pour aider les personnes dans cette construction, et les familles dans la prise de risque que cela implique.

La trisomie 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 devient particulièrement nécessaire. Moins aptes que d'autres à exprimer leur malaise, ou le faisant de façon détournée voire maladroite, le mal-être des personnes trisomiques est trop souvent ignoré. Famille et professionnels doivent présenter une vigilance particulière sur ce plan.

V.5 ACCOMPAGNEMENT ÉDUCATIF

Affirmer d'emblée la nécessité d'un accompagnement éducatif d'un enfant porteur de trisomie 21 revient à prendre le risque de laisser croire que la survenue d'un enfant handicapé dans une famille rend celle-ci incompétente pour l'éduquer. A l'inverse, il serait tout aussi vain de penser que ces personnes ne peuvent bénéficier utilement d'un 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. L'accès 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 s'agira :

- De rassurer les professionnels du milieu ordinaire sur leur compétence et leur savoir-faire vis à vis des personnes trisomiques pour lesquelles les cadres théoriques habituels gardent toute leur valeur, et d'aider ces professionnels à adapter le milieu ordinaire et leurs pratiques aux caractéristiques développementales particulières des personnes porteuses de trisomie 21, en rappelant les droits des personnes si nécessaire.
- D'être vigilant au réel développement de relations sociales des personnes trisomiques à l'intérieur des lieux fréquentés avec leurs pairs ordinaires. La construction d'un cadre relationnel positif est délicate et, à de rares exceptions près, ne semble pouvoir se construire que solidement encadré et soutenu par les adultes. Parallèlement, les échanges avec d'autres personnes trisomiques paraissent tout à fait primordiaux.

Un point particulier sur la **scolarisation** : l'accès à l'école ordinaire est de plein droit dans les mêmes conditions pour tous les enfants, quelle que soit sa situation. Ceci a bien été rappelé par la 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. Le but n'est pas simplement la présence de l'enfant dans une école ordinaire, c'est forcément avec un projet éducatif et un accompagnement adapté éducatif, social et psychologique. Non seulement il faut la conviction que cet enfant peut progresser, mais aussi une exigence adaptée aux difficultés qu'il rencontre. Il faut pouvoir adapter le programme et adapter la pédagogie. 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. Au moins la moitié des personnes porteuses de trisomie 21 devrait avoir les capacités de lecture et d'écriture "courantes".

V.6 AUTODÉTERMINATION

Permettre à une personne porteuse de trisomie 21 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 du Handicap, 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) [29, 30]. Les éducateurs et accompagnants deviennent des partenaires de la construction personnelle pour favoriser l'acquisition des comportements sous-jacents de l'autodétermination que sont :

- **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'insuffisance d'expériences et d'opportunités permettant d'assumer la responsabilité des choix de base et des décisions qui sont importantes dans sa vie quotidienne, la perception que l'on a souvent de ces personnes comme incapables d'assumer des rôles d'adulte, la présence d'environnements trop structurés, trop protecteurs, ne laissant pas de place pour proposer des opportunités, sont des freins à l'attitude d'autodétermination.

L'autodétermination, impose de mettre les personnes porteuses de trisomie 21 dans des situations d'expression de souhaits et de décisions personnelles, de façon précoce et fréquente. 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.

Le syndrome de l'X fragile

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Delphine Héron

Unité Fonctionnelle de Génétique Médicale AP-HP,

Département de Génétique et Cytogénétique,

Centre de Référence « Déficiences intellectuelles de causes rares »,

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, France ;

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Génétique moléculaire.....	3
II	Clinique.....	4
	II.1 Phénotype lié à la mutation complète du gène FMR1.....	4
	II.2 Phénotypes liés à la prémutation	5
III	Traitement.....	5
IV	conseil génétique.....	5
	IV.1 Lorsque le cas index est un patient porteur d'une déficience intellectuelle.....	6
	IV.2 Lorsque le cas-index est un patient avec un phénotype lié à une pré-mutation (FXTAS ou FXPOI).....	7
V	Diagnostic prénatal et pré-implantatoire.....	7

INTRODUCTION

Le syndrome de l'X fragile, lié à une mutation complète du gène *FMRI*, est la première cause de déficience intellectuelle (DI) héréditaire. La prévalence globale est de 1/5000, sans prédominance ethnique évidente. La transmission, liée à l'X, présente des particularités : filles possiblement atteintes, et hommes « transmetteurs » sans déficience intellectuelle.

Ce syndrome est responsable de DI chez 1 sujet masculin sur 4000, mais peut également atteindre les femmes avec une sévérité moindre et une fréquence d'environ 1 sur 7000.

I GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

La découverte de l'anomalie génétique en 1991 a permis la compréhension de ce mode de transmission inhabituel pour une pathologie liée à l'X en mettant en évidence un nouveau type de mutation jusqu'alors jamais décrit : il s'agit d'une mutation instable se caractérisant par des séquences répétitives de triplets CGG dans la partie non codante du gène. Le gène de l'X fragile, appelé *FMRI* (Fragile Mental Retardation), se situe sur le chromosome X au locus FRAXA, en Xq27.3. Il est composé de 17 exons (38 kb). L'expansion de triplets se situe au niveau du premier exon. Chez le sujet sain, la séquence répétitive existe sous forme de polymorphisme et comporte une moyenne de 29 CGG (de 6 à 49).

La mutation s'exprime en 2 temps : une pré-mutation caractérisée par un allongement comprenant 59 à 200 copies du triplet CGG, et une mutation complète caractérisée par une expansion supérieure à 200 copies, pouvant aller jusqu'à 1000 répétitions et entraînant un phénotype X fragile de DI. Cet état de mutation complète entraîne une méthylation de l'îlot CpG (région promotrice du gène) à l'origine d'une abolition en 3' de la transcription et donc d'une absence de la protéine. Cette méthylation anormale est à la base de la technique diagnostique. Entre 50 et 59, il s'agit d'une zone « intermédiaire pour laquelle une instabilité est possible lors de la transmission mais une transition en mutation complète n'a jamais été rapportée.

Le gène *FMRI* code pour une protéine RNA-binding (FMRP). L'ARN messager correspondant à un transcrit de 4,4 kb, présent dans la plupart des tissus avec une expression maximale dans le cerveau et le testicule. La protéine FMRP (70 kDa) est sans homologie structurale par rapport aux protéines cytoplasmiques connues. Son expression est également importante dans le cerveau et les testicules. Elle est présente chez l'homme normal et en cas de pré-mutation, et absente en cas de mutation complète.

Le mécanisme moléculaire d'amplification de triplets rend compte de la grande majorité des patients porteurs du syndrome de l'X fragile. D'autres anomalies (mutations), beaucoup

plus rares ont également été décrites avec des mutations complètes ou des délétions, confirmant que le gène *FMR1* est bien responsable du syndrome de l'X fragile.

Le phénotype clinique des patients porteurs d'une anomalie du gène *FMR1* est fonction du type d'anomalie (mutation complète ou pré-mutation), et du sexe.

II CLINIQUE

II.1 PHÉNOTYPE LIÉ À LA MUTATION COMPLÈTE DU GÈNE *FMR1*

Le tableau clinique lié à la mutation complète du gène *FMR1* est variable, et fonction du sexe de l'individu porteur.

- **Chez le garçon**

La déficience intellectuelle est constante, de gravité variable.

Les signes cliniques sont initialement peu spécifiques, et il s'agit le plus souvent d'un retard de développement, en particulier du langage, avec des troubles du comportement. Les acquisitions motrices sont en général peu retardées. Les troubles du langage occupent une place particulière car ils sont quasiment constants : l'expression verbale est retardée et inférieure au niveau de compréhension. Les troubles de l'attention et le comportement hyperkinétique sont fréquemment un motif de consultation. Ces troubles ont tendance à s'amender dans le temps contrairement au déficit intellectuel (il semble exister un déclin progressif des performances avec l'âge). Il peut parfois exister également des troubles du spectre autistique.

D'autres signes associés peuvent être présents, mais aucun n'est pathognomonique, et leur absence ne doit pas faire récuser le diagnostic. Parmi les signes initialement décrits, on note la dysmorphie faciale caractérisée par un visage allongé et de grandes oreilles décollées, et la macro-orchidie post-pubertaire (« Martin Bell syndrome »), inconstants. Il peut également exister une avance staturale avec normo ou macrocéphalie, une grande fontanelle, des extrémités larges et une hyperlaxité articulaire. La comitialité est fréquente, ou au moins des anomalies de l'électroencéphalogramme.

- **Chez la fille**

L'expression clinique chez les filles présentant une mutation complète est très variable : 40% environ n'ont pas de signe clinique, et 60% ont une DI globalement plus modérée que chez les garçons. Les symptômes peuvent être modérés et se limiter à des troubles du comportement et de la relation (timidité, anxiété massive, tendance dépressive...).

Il faut toutefois se rappeler que les signes cliniques ne sont ni spécifiques, ni constants et, notamment chez le jeune enfant, le retard mental est parfois le seul signe d'appel.

II.2 PHÉNOTYPES LIÉS À LA PRÉMUTATION

Dans tous les cas, et en l'état actuel des connaissances, il n'y a pas de risque de déficience intellectuelle

- **Chez l'homme**

Il existe un risque de développer un syndrome neurodégénératif (*FXTAS : fragile X tremor ataxia syndrome*) associant une ataxie cérébelleuse, un tremblement d'intention, une atteinte cognitive (mémoire, comportement, fonctions exécutives) et un syndrome parkinsonien. Ce risque augmente avec la taille de la prémutation et l'âge de l'individu

- **Chez la femme**

Il existe un risque d'environ 20 % d'insuffisance ovarienne prématurée (*FXPOI : fragile X premature ovarian failure*). Le risque de *FXTAS* est mal connu, plus faible que chez l'homme.

III TRAITEMENT

Pour le syndrome de l'X Fragile lié à la mutation complète, il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapeutique curative spécifique, mais une prise en charge symptomatique pluridisciplinaire (orthophonie, psychothérapie, kinésithérapie...) et socio-éducative en fonction du tableau clinique doit être débutée le plus rapidement possible. Des essais thérapeutiques sont actuellement en cours.

Pour les phénotypes liés à la prémutation (*FXTAS* et *FXPOI*), la prise en charge est également symptomatique.

Le diagnostic étiologique moléculaire permet un conseil génétique pour les apparentés

IV CONSEIL GÉNÉTIQUE

L'originalité et la difficulté du conseil génétique des mutations du gène *FMR1* tient à plusieurs particularités :

- Le caractère toujours héréditaire, avec passage d'une prémutation à une mutation complète uniquement lors de la méiose maternelle.
- La fréquence élevée d'un phénotype de sévérité très variable chez les filles porteuses de la mutation complète (difficultés cognitives ou psychiques, parfois déficience intellectuelle)
- L'existence de plusieurs pathologies distinctes du syndrome de l'X fragile, associées aux prémutations : Insuffisance ovarienne précoce (*FXPOI*) chez les femmes, et syndrome neurodégénératif (*FXTAS*) à partir de la cinquantaine, majoritairement

chez les hommes porteurs de la prémutation, influencé par la taille de la prémutation.

L'attitude du généticien par rapport à la demande de test génétique d'un consultant asymptomatique ne peut être stéréotypée et sera adaptée en fonction de plusieurs critères, dont le sexe du consultant, son âge et le fait qu'il ait déjà (ou souhaite avoir) des enfants. En effet, l'enjeu principal du test génétique chez un patient asymptomatique est d'évaluer le risque d'avoir un enfant atteint d'une déficience intellectuelle (c'est à dire porteur d'une mutation complète).

IV.1 LORSQUE LE CAS INDEX EST UN PATIENT PORTEUR D'UNE DÉFICIENCE INTELLECTUELLE

Cette déficience est toujours liée à une mutation complète du gène *FMRI*. La première étape du conseil génétique est de déterminer le statut génétique de sa mère, transmettrice obligatoire, sous forme d'une pré-mutation ou d'une mutation complète, puis d'identifier la branche de la famille « à risque » (ce qui pose la question des modalités du test génétique chez les grands-parents).

En effet :

- 1) La mise en évidence d'une mutation complète chez la mère du patient signifie que la transmission a été grand-maternelle et restreint la nécessité de transmission de l'information sur le risque à cette branche de la famille.
- 2) En cas de prémutation chez la mère, par contre, la maladie peut indifféremment avoir été transmise par l'un ou l'autre parent. La branche grand-paternelle est donc également potentiellement concernée.

Dans tous les cas, la détermination du statut génétique chez les grands parents peut déclencher ou majorer un sentiment de culpabilité. De plus, ce test a une valeur prédictive en ce qui concerne le risque de FXTAS, principalement chez le grand-père, mais pas uniquement. Il peut donc exister un conflit d'intérêt entre le droit de ne pas savoir d'un grand-père et le droit de savoir de ses apparentés (identification de la « branche à risque »). Les enjeux du test doivent donc être évalués en consultation individuelle pour prendre en compte l'histoire singulière de chaque famille, si possible avec l'aide d'un psychologue formé à ces questions. Il faut savoir ne pas prélever lors de la première consultation, afin de laisser le temps à la réflexion. Le droit de ne pas savoir doit pouvoir être préservé mais il faut anticiper la possibilité que le test génétique effectué à la génération suivante risque de confirmer le statut du grand-parent transmetteur.

IV.2 LORSQUE LE CAS-INDEX EST UN PATIENT AVEC UN PHÉNOTYPE LIÉ À UNE PRÉ-MUTATION (FXTAS OU FXPOI)

Dans ce cas de figure et sauf exception, l'un des parents est forcément porteur d'une prémutation.

1) Insuffisance ovarienne précoce : ces patientes présentent un risque de ne pas avoir d'enfants (don d'ovocytes) mais également un risque de grossesse spontanée chez une femme déclarée infertile avec la problématique d'une grossesse non désirée ou d'un diagnostic prénatal.

2) FXTAS: ce syndrome se déclare souvent tardivement, alors que les enfants sont déjà nés et parfois en âge d'avoir eux même des enfants ou en ayant déjà. Les filles d'un homme présentant un FXTAS sont conductrices obligatoires (prémuation), sauf situation exceptionnelle. La fratrie et descendance de celle-ci sont à risque. Par contre, les fils n'ont pas de risque d'être porteurs (test génétique inutile).

L'étude de l'arbre généalogique de la famille associée aux résultats des examens de biologie moléculaire permet donc de déterminer le risque de chaque sujet de la famille et de sa descendance.

Chez une femme prémutée, le risque théorique du passage de la prémutation à la mutation complète dépend de la taille de la prémutation . Ce risque se situe entre 17 et 100 % quand elle transmet le chromosome porteur de l'X fragile. Si celle-ci a déjà un enfant atteint, le risque pour les grossesses suivantes est voisin de 100 % de transformation de prémutation en mutation complète (donc de 50 % d'avoir un enfant atteint).

V DIAGNOSTIC PRÉNATAL ET PRÉ-IMPLANTATOIRE

Un couple dont la femme est conductrice pour le syndrome de l'X fragile (porteuse d'une prémutation ou d'une mutation complète) peut souhaiter un diagnostic prénatal. Celui-ci sera le plus souvent effectué par ponction de villosités chorales à 12 SA. Le diagnostic moléculaire prénatal est délicat et fait appel à plusieurs techniques complémentaires afin de déterminer le sexe du fœtus et son statut génétique vis-à-vis de l'expansion de triplets du gène *FMR1*. Dans certains cas (filles), il peut être nécessaire d'avoir recours à un deuxième prélèvement (amniocentèse) afin de pouvoir conclure de façon fiable.

Compte tenu de la grande variabilité d'expression clinique chez les femmes porteuses de la mutation complète, l'attitude vis-à-vis d'un fœtus féminin porteur sera appréciée en fonction du contexte familial et des souhaits des parents. S'ils ne souhaitent pas demander d'interruption médicale de grossesse pour un fœtus de sexe féminin quel que soit son statut

génétique, il est possible d'effectuer une étude du sexe fœtal sur sang maternel et de n'effectuer la ponction de villosités chorales qu'en cas de fœtus masculin.

Une consultation de génétique préalable est indispensable avant tout diagnostic prénatal, afin d'expliquer la situation aux parents et qu'ils puissent envisager leur attitude selon les résultats.

La mucoviscidose : du gène CFTR au conseil génétique

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

C. FÉREC

Laboratoire de Génétique Moléculaire – C.H.R.U. Brest

Directeur de l'Inserm U613

« Génétique Moléculaire et Génétique Epidémiologique »

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Le gène CFTR et ses mutations.....	5
II	Les classes de mutations.....	6
III	Les relations génotype/phénotype.....	6
IV	ApPort de la connaissance du gène au diagnostic de la mucoviscidose.....	7
	IV.1 Diagnostic moléculaire.....	8
	IV.2 Dépistage néonatal.....	9
V	Le conseil génétique.....	9
	V.1 Prise en charge des couples à risque de 1/4.....	9
	V.2 Prise en charge des couples à risque de 1/2	11
	V.3 Couples à risque a priori de 1/120.....	12
	NOTE(S) DU CHAPITRE	12
VI	Le diagnostic de mucoviscidose au cours de la grossesse.....	13
VII	La prise en charge des couples confrontés à un problème de stérilité par absence de canaux déférents.....	13
VIII	Les pathologies associées à des dysfonctionnements de la protéine CFTR (CFTR-RD)...	14
IX	Les espoirs thérapeutiques.....	14
X	Annexes.....	16

La mucoviscidose, encore appelée fibrose kystique du pancréas, est classiquement considérée comme la plus fréquente des maladies génétiques graves de l'enfant dans les populations d'Europe du nord ouest et d'Amérique du nord. Les progrès qui ont été accomplis au cours des dernières décennies dans la prise en charge de cette maladie ont conduit à améliorer considérablement l'espérance de vie des patients, et aujourd'hui près de la moitié d'entre eux sont des adultes.

L'expression clinique de la maladie se traduit essentiellement par une atteinte pulmonaire et digestive (1). Au plan pulmonaire, il s'agit d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive caractérisée par une production d'un mucus abondant épais, colonisé par une flore spécifique. *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* sont les premiers microorganismes retrouvés dans la flore, suivis quelques années voire quelques dizaines d'années plus tard, par une colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. Cette colonisation marque en général un tournant dans l'histoire de la maladie et son éradication devient difficile. Des atélectasies surviennent chez environ 5 % des patients et le pneumothorax est une complication fréquente. L'atteinte pulmonaire est responsable de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité de la maladie.

Au plan gastro-intestinal, la manifestation clinique la plus précoce est la présence d'un iléus méconial qui survient chez 15 % environ des nouveau-nés. La maladie pancréatique - une insuffisance du pancréas exocrine - est présente chez 85 % des enfants à la naissance. La suffisance pancréatique est génétiquement déterminée, présente chez les enfants porteurs d'au moins une mutation peu sévère. Enfin, 95 % des hommes ont une absence de canaux déférents se traduisant par une stérilité par azoospermie excrétoire. La fertilité chez les femmes est également diminuée, mais le nombre de grossesses chez les femmes atteintes de mucoviscidose est en augmentation constante depuis deux décennies.

La mucoviscidose se transmet sur le mode autosomique récessif, et elle affecte un nouveau-né sur 4500 en France avec des différences loco-régionales significatives en terme d'incidence (une naissance pour 3000 en Bretagne, une naissance pour 7000 en Languedoc Roussillon) (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 20ème siècle à la suite des travaux de Di Sant' Agnese, qui découvrit que la sueur de ces enfants était anormalement riche en sel et proposa un test biologique : le test de la sueur mesurant la concentration en ion chlorure (Cl-) et en sodium de la sueur. Une valeur du test supérieure à 60 mEq/l reste aujourd'hui le test diagnostique de référence et est très spécifique de la maladie (4).

Le gène responsable de la mucoviscidose – le gène *CFTR* (pour Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) – a été identifié en 1989 (5-7). Cette date a marqué un tournant dans l'histoire de la maladie. La connaissance du gène a permis de progresser non seulement en matière de diagnostic, mais elle a également ouvert de nouvelles perspectives en terme de compréhension de la physiopathologie de la maladie avec l'espoir de mise au point de thérapies spécifiques de la maladie.

I 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 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 (Adénosine MonoPhosphate cyclique) (9). Ce canal de faible conductance est un régulateur d'autres canaux, en particulier des canaux sodiques comme le canal ENaC (*Epithelial Na Channel*) ou le canal chlorure à rectification sortante (ORCC, *Outwardly Rectifying Chloride Channel*) ((10;11).

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'Etude des Mutations du Gène (Cystic Fibrosis Gene Mutation Analysis : <http://www.genet.sickkids.on.ca>) (12) 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. La fréquence de quatre autres mutations dépasse le seuil de 1 % (G542X (p.Gly542X) ; G551D (p.Gly551Asp) ; 1717-1G>A (c.1585-1G>A) ; W1282X (p.Trp1282X)) et à côté de cela, il existe aujourd'hui 1800 mutations répertoriées, dispersées au sein des 27 exons du gène. Ce sont souvent des événements rares ou privés, témoignant de l'extraordinaire variabilité allélique présente dans le gène *CFTR* (13).

Le type de mutations, leurs fréquences varient beaucoup selon l'origine géographique et ethnique des patients (14), et il est important, pour orienter le laboratoire dans sa recherche de mutations, de bien documenter les origines géographiques des patients et de leurs parents. Pour illustrer ceci, on peut rappeler que la mutation W1282X est la mutation la plus fréquente dans la population juive Ashkénaze (15) tandis que la mutation G551D rend compte de 5 % des mutations dans les populations d'origine celte (16). La mutation G542X est fréquente dans les populations du pourtour méditerranéen.

II LES CLASSES DE MUTATIONS

Les 1800 mutations de ce gène, qui sont essentiellement des mutations ponctuelles, ont pu être réparties en cinq classes selon l'impact qu'elles produisent sur la fonction de la protéine (17) :

- Les mutations de classe 1 sont des mutations non sens ou des délétions/insertions, plus rarement de grande 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 F508del 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 (*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.

III LES RELATIONS GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE

La découverte des mutations du gène *CFTR* a, depuis 20 ans, ouvert un champ nouveau de recherche qui nous permet 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 sur la variabilité de l'expression clinique observée chez les patients atteints de mucoviscidose (18).

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 (19).

Les mutations dites sévères sont associées, sur le plan phénotypique, à une insuffisance pancréatique et à une atteinte pulmonaire qui débute dans l'enfance. Ce sont les formes de présentation classique de la maladie et les patients homozygotes F508del en sont les exemples les plus fréquemment rencontrés (20).

En revanche, 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 F508del (21).

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 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 (tabagisme, pollution, facteurs socio-économiques, compliance au traitement, ...) et par d'autres facteurs génétiques que l'on appelle des gènes modificateurs (gènes impliqués dans la réponse immunitaire, dans l'inflammation, ...) (22).

IV 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 Rosentein et Cutting (23). Ces critères sont les suivants :

- association, chez un patient, d'un ou plusieurs traits phénotypiques de la maladie ou existence d'un apparenté atteint ou existence d'un test de dépistage néonatal positif,

- et présence d'un test de la sueur positif en deux occasions ou présence d'une mutation causale en double exemplaire.

L'évolution des techniques de biologie moléculaire a été considérable au cours de ces vingt 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.

IV.1 DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

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 par une technique dite de balayage, 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 1800 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* (24-26).

Au terme de cette recherche, il reste environ 1 à 2 % des sujets atteints de mucoviscidose (selon l'origine géographique ou ethnique) 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 Etats-Unis ou au Canada, ce taux de couverture atteint de 95 à 98 %. 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*.

IV.2 DÉPISTAGE NÉONATAL

Mis en place dans les années 90 dans quelques régions de France ainsi que dans quelques pays dans le monde, le dépistage néonatal a reposé initialement sur la présence dans le sang des nouveau-nés, au 3ème jour de vie, d'une hypertrypsinémie 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 du trypsinogène et la recherche des mutations les plus fréquentes du gène. Ceci a permis d'associer la sensibilité de l'hypertrypsinémie à la spécificité du dépistage des mutations du gène *CFTR* et d'aboutir à un test de dépistage qui est maintenant en place en France depuis 10 ans et qui s'étend progressivement à tous les pays européens et aux Etats-Unis. Ce dépistage permet de diagnostiquer précocement la maladie et d'assurer dans les centres cliniques spécialisés (les CRCM : Centres de Ressources et de Compétences sur la Mucoviscidose) la prise en charge précoce des enfants atteints (27;28).

Ce test de dépistage en deux étapes conduit à identifier quelques nouveau-nés simplement hétérozygotes. Ces familles sont adressées en consultation de conseil génétique pour bien les informer sur le statut d'hétérozygote asymptomatique de leur enfant, vérifier l'origine paternelle ou maternelle de la mutation et repérer le cas échéant les couples à risque de 1/4 qui pourront bénéficier lors d'une prochaine grossesse d'un diagnostic prénatal. Bien évidemment il ne s'agit pas d'un dépistage des hétérozygotes en population et le nombre d'hétérozygotes ainsi repéré est faible au regard de la fréquence des hétérozygotes au sein de la population (1/35).

V LE CONSEIL GÉNÉTIQUE

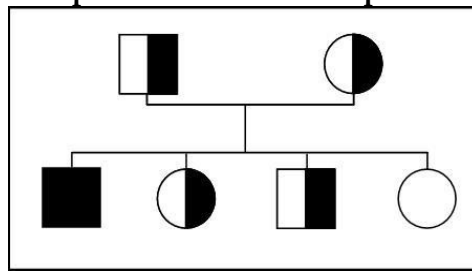
Lorsqu'un diagnostic de mucoviscidose est posé, au delà de la prise en charge de l'enfant en milieu spécialisé, une prise en charge génétique s'impose pour le couple et ses apparentés (28). C'est en ayant en main l'ensemble des connaissances accumulées depuis 20 ans que l'on peut proposer un conseil génétique (*cf.note : 1*) éclairé aux patients, à leurs familles et plus largement à leur 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 varie de 1/3000 à 1/7000 selon les régions, le taux de porteurs de l'allèle muté dans la population est de 1/30 à 1/35.

V.1 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 1**). 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. Il peut également s'agir 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) ou suite à la détection d'un intestin hyperéchogène lors du suivi échographique des grossesses.

Figure 1 : Représentation d'un couple à risque de 1/4



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, 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 fœtal 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 présence de matériel paternel, 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 fœtal. Si l'une des mutations n'est pas connue, on s'appuiera sur un diagnostic indirect en utilisant des marqueurs polymorphes intra ou extra géniques qui caractérisent le chromosome porteur de l'allèle délétère inconnu (30).

Nous avons récemment fait le bilan de notre activité de 15 années de diagnostic prénatal de mucoviscidose et nous avons pu montrer que la spécificité de l'analyse de biologie moléculaire était de 100 % (31). Il faut également noter à ce propos que la très grande majorité (96 %) des couples à risque de 1/4; pour lesquels le diagnostic de mucoviscidose fœtale est porté opte pour une demande d'Interruption pour motif Médical de la Grossesse (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 (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) qui permet d'injecter l'ADN d'un spermatozoïde dans un ovocyte (32). Il s'agit ensuite d'analyser au stade 6/8 cellules le blastocyste en prélevant une cellule 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 a en trois en France : CHRU Montpellier - Mireille Claustres ; APHP, Paris - Arnold Munnich ; CHRU Strasbourg - Stéphane Viville). Le délai d'attente est long, ce qui en limite l'accès, et sont considérées comme prioritaires les femmes qui ont déjà dû subir plusieurs IMG à la suite de diagnostics prénatals malheureusement positifs.

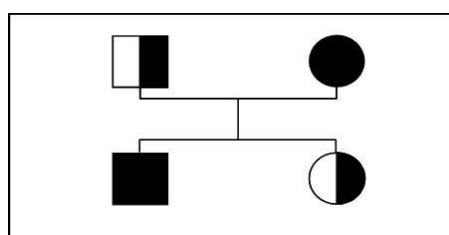
V.2 PRISE EN CHARGE DES COUPLES À RISQUE DE 1/2

Les progrès réalisés ces dernières décennies dans la prise en charge de la mucoviscidose font que les patients sont de plus en plus nombreux à avoir des projets de vie de couples et 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 par agénésie bilatérale des canaux déférents. Ces derniers doivent donc être adressés vers 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 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'écartier 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; (**Figure 2**), et un diagnostic prénatal leur sera proposé dans le cadre d'une consultation de génétique.

Figure 2 : Représentation d'un couple à risque de 1/2



V.3 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 *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 pour habitude de proposer une étude plus complète du gène par criblage systématique des exons les plus fréquemment mutés, ce qui nous permet d'écarter au moins 95 % des mutations du gène et de proposer à ces couples un risque résiduel de mucoviscidose pour leurs enfants de 1/2500. Ce risque devient proche du risque 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 décrits précédemment.

NOTE(S) DU CHAPITRE

1 : Les calculs de risque décrits dans ce chapitre sont réalisés en considérant un taux de porteurs de 1/30, qui correspond au risque moyen pour un individu d'être hétérozygote en Europe.

VI LE DIAGNOSTIC DE MUCOVISCIDOSE AU COURS DE LA GROSSESSE

L'examen systématique par échographie des femmes au cours de la grossesse a conduit les gynécologues ou 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 deuxième trimestre, est associée (selon les expériences rapportées dans la littérature) dans 3 % à 9 % des cas à un diagnostic de mucoviscidose *in utero* (33;34). La détection d'une telle image justifie donc 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 précisément qu'aujourd'hui 10 % des enfants atteints de mucoviscidose étaient diagnostiqués *in utero*, suite à la découverte d'un intestin hyperéchogène (34;35).

Ces couples sont confrontés à la décision importante et brutale 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 la mucoviscidose, de son évolution clinique et les accompagner au mieux dans leur prise de décision. Il faudra également les informer du risque de récurrence de 25 % pour les grossesses suivantes.

VII 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 petit garçon (36). Dans plus de 50 % des agénésies, on trouve au moins une mutation du gène *CFTR* et dans 30 % 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* (37;38).

Ces hommes stériles sont à risque *a priori* de 50 % d'être porteurs et il importe 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 $\frac{1}{4}$ de mucoviscidose car ces couples aujourd'hui vont pouvoir bénéficier dans le cadre d'un projet parental de fécondation *in vitro* par des techniques d'*ICSI*, avec un taux de succès non négligeable puisque 40 % de ces fécondations *in vitro* vont aboutir à la naissance d'un enfant (32).

VIII 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 (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, de pancréatites chroniques, de dilatation des bronches voire d'hypertrypsinémie néonatale (39).

IX LES ESPOIRS THÉRAPEUTIQUES

Peu de temps après 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 fallu 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, 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 vectorologie 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 unes appelées « correcteurs » et les secondes « potentiateurs ». Les premiers ont pour objectif de corriger l'adressage défectueux à la membrane de la protéine CFTR et le mauvais repliement de la protéine, et les seconds visent à potentialiser l'ouverture du canal chlorure. Une molécule - le Vertex 770 - est ressortie d'un crible réalisé par une firme pharmaceutique la firme 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 (40). Ces travaux illustrent bien 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 précoce et la connaissance exhaustive des mutations du gène, préalable indispensable à la mise en place de ces nouvelles thérapeutiques.

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 plus de 1800 mutations ont été rapportées dans ce gène. Le développement des techniques de biologie moléculaire nous permet désormais en quelques jours d'identifier l'une de ces 1800 mutations et de confirmer

ou d'infirmier 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 (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 et ce grâce aux financements de la DHOS (Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins). Cette organisation du diagnostic moléculaire, la mise en place du dépistage systématique en période néonatale, conjointement avec la mise en place des CRCM organisant la prise en charge clinique des enfants au sein de service dédié et spécialisé dans la prise en charge de la maladie, tout cela a contribué à améliorer notamment l'espérance de vie des enfants atteints de mucoviscidose en France (41). Les laboratoires de génétique moléculaire 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 - Claude Férec ; APHP, Hôpital H. Mondor, Créteil - Michel Goossens ; CHRU Montpellier - Mireille Claustres ; APHP, Hôpital Cochin, Paris - Thierry Bienvenu).

Ce maillage du territoire permet d'offrir aux patients, quelle que soit leur situation en France, un diagnostic moléculaire de qualité permettant de donner aux patients et 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 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 le développement de thérapies spécifiques des dysfonctionnements de la protéine CFTR.

X ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso FJ, Cutting GR. 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. p. 5121-88.

- (10) Ismailov II, Awayda MS, Jovov B, Berdiev BK, Fuller CM, Dedman JR et al : Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 1996;271:4725-32.
- (11) Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR et al. : CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 1995;81:1063-73.
- (12) Tsui LC. : Cystic Fibrosis Mutation Database.
- (13) Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrell PM. : Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002;19:575-606.
- (14) : Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1994;4:167-77.
- (15) Shoshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, Rivlin Y 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.
- (16) Férec C, Audrézet MP, Mercier B, Guillermit H, Moullier P, Quéré I et al : Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nat Genet* 1992;1:188-91.
- (17) Welsh MJ, Smith AE. : Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993;73:1251-4.
- (18) : Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993;329:1308-13.
- (19) Zielenski J, Tsui LC. : Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995;29:777-807.:777-807.
- (2) Recommandation : Registre Français de la Mucoviscidose. Rapport 2007
- (20) Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H 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.
- (21) Férec C, Mercier B, Audrézet MP. : Les mutations de la mucoviscidose : du génotype au phénotype. *Médecine/Sciences* 1994;10:631-9.
- (22) Cutting GR. : Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann NY Acad Sci* 2010;1214:57-69.

- (23) Rosenstein BJ, Cutting GR. : The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998;132:589-95.
- (24) Audrézet MP, Chen JM, Raguénès O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Maréchal C et al. : Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 2004;23:343-57.
- (25) Niel F, Legendre M, Bienvenu T, Bieth E, Lalau G, Sermet I et al. : A new large CFTR rearrangement illustrates the importance of searching for complex alleles. *Hum Mutat* 2006;27:716-7.
- (26) Férec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek M, Jr., Bienvenu T, Holubova A 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.
- (27) Scotet V, De Braekeleer M, Roussey M, Rault G, Parent P, Dagorne M et al. : Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France: assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis. *Lancet* 2000;356:789-94.
- (28) Munck A, Sahler C, Briard M, Vidailhet M, Farriaux JP. : [Cystic fibrosis: the French neonatal screening organization, preliminary results]. *Arch Pediatr* 2005;12:646-9.
- (29) McIntosh I, Raeburn JA, Curtis A, Brock DJ. : First-trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis by direct gene probing. *Lancet* 1989;2:972-3.
- (3) Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das : Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien. *Wien Med Wochenschr* 1936;86:753-6.
- (30) Férec C, Verlingue C, Audrézet MP, Guillermit H, Quéré I, Raguènes O et al. : Prenatal diagnosis of cystic fibrosis in different European populations : application of denaturing gradient gel electrophoresis. *Fetal Diagn Ther* 1993;8:341-50.
- (31) Scotet V, Duguépéroux I, Audrézet MP, Blayau M, Boisseau P, Journel H et al. : Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: the 18-year experience of Brittany (western France). *Prenat Diagn* 2008;28:197-202.
- (32) Handyside AH. : Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reprod Biomed Online* 2010;21:280-2.
- (33) Simon-Bouy B, Satre V, Férec C, Malinge MC, Girodon E, Denamur E et al. : Hyperechogenic fetal bowel: a large French collaborative study of 682 cases. *Am J Med Genet A* 2003;121A:209-13.

- (34) Scotet V, De Braekeleer M, Audrézet MP, Quéré I, Mercier B, Duguépéroux I 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.
- (35) Scotet V, Duguépéroux I, Audrézet MP, Audebert-Bellanger S, Muller M, Blayau M et al. : Focus on cystic fibrosis and other disorders evidenced in fetuses with sonographic finding of echogenic bowel: 16-year report from Brittany, France. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:592-6.
- (36) Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Lafitte JJ, Manouvrier S, Biserte J et al. : Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990;336:512.
- (37) Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S 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.
- (38) Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber Sherman J, Novelli G, Bonduelle M 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.
- (39) Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derish N, Dodge J, Girodon E et al. : Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10:86-102.
- (4) Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. : Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953;12:549-63.
- (40) Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR et al. : Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N.Engl.J Med.* 2010;363:1991-2003.
- (41) Roussey M, Desrues B, Turck D, Perez T, Wallaert B, : Centres de soins pour la mucoviscidose de Rennes et de Lille. Centres de soins d'adultes pour la mucoviscidose : critères requis, organisation pratique. *Rev Mal Respir* 2000;17:733-8.
- (5) Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M et al : Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.
- (6) Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z 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, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A et al. : Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.

- (8) Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Chumm JW et al. : Cystic fibrosis locus defined by a genetically polymorphix DNA marker. Science 1985;230:1054-7.
- (9) Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC et al. : Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science 1991;253:202-4.